UNIVERSITÉ DE PARIS
Année 1966

FACULTÉ DE PHARMACIE
Série U - N° 438

THÈSE

présentée

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention

DU TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Mention Pharmacie)

par

Eliane de LAVAUR

soutenue le 5 Juillet 1966

RECHERCHES SUR LE METABOLISME ET LA REPARTITION DU DINITRO 4 - 6 ORTHOCRESOL CHEZ LE LAPIN.

APPLICATIONS A L'ÉTUDE DES RISQUES POUR LE GIBIER POUVANT RESULTER DES EMPLOIS DE CE COMPOSÉ COMME HERBICIDE EN AGRICULTURE.

JURY : **MM. TRUHAUT,** Président
PARIS,
LE MOAN, Examinateurs

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544321_0006

UNIVERSITÉ DE PARIS
Année 1966

FACULTÉ DE PHARMACIE
Série U - N° 438

THÈSE

présentée

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention

DU TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

(Mention Pharmacie)

par

Eliane de LAVAUR

soutenue le 5 Juillet 1966

RECHERCHES SUR LE METABOLISME ET LA REPARTITION DU DINITRO 4 - 6 ORTHOCRESOL CHEZ LE LAPIN.

APPLICATIONS A L'ÉTUDE DES RISQUES POUR LE GIBIER POUVANT RESULTER DES EMPLOIS DE CE COMPOSÉ COMME HERBICIDE EN AGRICULTURE.

JURY : **MM. TRUHAUT,** Président
PARIS,
LE MOAN, Examinateurs

PERSONNEL DE LA
FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

VALETTE G. ..... Doyen
JANOT M.M. ..... Assesseur
RAOUL Y ..... Assesseur
RODINEAU L ..... Secrétaire Général
FERRARI (Mme S.) ..... Attachée Principale
JEANDEL L ..... Attaché
ESPINASSE (Mme M.L.) ..... Attachée
PEILLON (Mme C.) ..... Attachée
BRENN A. ..... Attaché
JACOB A. ..... Attaché

DOYEN HONORAIRE

FABRE R. ..... Membre de l'Institut

PROFESSEURS HONORAIRES

LAUNOY L.
FLEURY P.
PICON M.
BEDEL C.
FABRE R. ..... Membre de l'Institut

P R O F E S S E U R S

JANOT M. M.	Pharmacie Galénique (T)
VALETTE G.	Pharmacodynamie (T)
PARIS R.	Histcire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T)
GUILLOT M.	Physique (T)
GAUTIER J.A	Chimie organique (T)
LAMBIN (Mle S.)	Microbiologie (T)
RAOUL Y.	Physiologie (T)
COURTOIS J.	Chimie biologique (T)
DOMANGE L.	Chimie générale et minérale (T)
TRUHAUT R.	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
MORETTE A.	Hydrologie (T)
CAVIER R.	Parasitologie (T)
QUEVAUVILLER A.	Hygiène et Education sanitaire (T)
MOREAU R.	Pharmacie chimique (T)
GERMAN A.	Virologie et Sérologie (T)
PIETTE M.	Biologie sanguine (T)
MALANGEAU P.	Chimie analytique (T)
GIRARD M.	Biochimie Appliquée (T)
DILLEMANN G.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
DEYSSON G.	Botanique (T)
FLAHAUT J.	Minéralogie (T)
RENAULT J.	Chimie organique (T)
LE HIR A.	Pharmacie galénique
BOUDENE C.	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
LARUELLE P.	Physique
ROSSIGNOL P.	Pharmacodynamie
MANGEOT A.	Pharmacie galénique industrielle
DELAVEAU P.	Matière médicale
COHEN Y.	Sciences naturelle (pharmacodynamie)

RENAULT H.	Physique
BOURDON R.	Chimie analytique
REYNAUD P.	Pharmacie Chimique

M A I T R E S DE C O N F E R E N C E S

LE MOAN G.	Toxicologie
PAOLETTI C.	Toxicologie
POISSON J.	Pharmacie galénique
DESVIGNES A.	Cryptogamie et technique bactériologique
PERCHERON F.	Chimie Biologique
SAVEL J.	Biologie animale
BORY M.	Microbiologie
MIOCQUE M.	Chimie organique
GUIGNARD J.-L.	Botanique Générale
GOUNELLE J.-C.	Physiologie
BINET P.	Biologie animale
COMBET-FARNOUX C.	Chimie organique
PLAT (Mme M.)	Législation et Déontologie pharmaceutique
DELACOUX E.	Pharmacie Chimique
ADOLPHE C.	Physique
DIDRY J.	Mathématiques appliquées aux sciences expérimentales
GUERNET M.	Chimie analytique
KHODADAD P	Chimie minérale
LEDOUBLE G.	Chimie minérale

C H E F S D E T R A V A U X P R A T I Q U E S

ASTIN C. (F.F)	Physique
AYMARD P. (F.F)	C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments, Section Biologie
BLANC (Mme J.)	Chimie organique
BONNET C. (F.F)	Mathématiques
BOURNIQUE (Mle C.) (F.F)	Physiologie végétale
CARLIER A. (F.F)	C.E.S Pharmacie Galénique Industrielle
CENAC (Mme J.) (F.F)	C.E.S. Parasitologie Pharmaceutique et Technique
CHARPENTIER (Mme M.)	Chimie préparation
CHARLES J. (F.F)	Mathématiques
CHOIX (Mle M.)	Pharmacie Galénique
DAGRON C.	Chimie organique
COMPAGNON P. (F.F)	Chimie organique
DECAUDIN (Mle M.T)	Parasitologie
DREUX C.	C.E.S. Electrochimie appliquée à l'analyse
DUMANT G. (F.F)	Chimie Préparation
ETIENNE J. (F.F)	Physique
FLEURY (Mle S.)	Chimie
GESTEAU P.	C.E.S. de Biochimie
GOURSAT (Mle M.J.) (F.F)	Botanique
GUERIN H.	Essais des drogues végétales
HAMON M.	Chimie analytique
HARISPE (Mme M.)	Chimie organique
HAZEBROUCQ G.	Physique
HENRY J.	Chimie
HUBERT (Mme J.)	C.E.S. Bactériologie Pharmaceutique et Technique.
HURON (Mme M.J.) (F.F)	Mathématiques
JUND (Mle Y.)	C.E.S. Immunologie
LAROCHE J.	Physique
LEGER (Mme N.) (F.F)	Zoologie

LELUC R.	Microbiologie
LEMONNIER A.	Chimie analytique
LONGEVIALLE (Mle M.) (F.F)	Botanique
LONGUEVALLE (Mle S.)	Chimie analyses
MANDEREAU J. (F.F)	C.E.S. Pharmacotechnie chimique et galénique
MARTIN-FRERE H.	Chimie organique
MORIN (Mle H.)	C.E.S. Pharmacodynamie et essais biologiques des médicaments
MOSKOWITZ H.	Chimie organique
NOTTEGHEM (Mme M.) (F.F)	Zoologie
NGUYEN PHU LICH (F.F)	C.E.S. Toxicologie et études sanitaires
PERLES R.	C.E.S. Biochimie
PESTIS J. (F.F.)	Biologie animale
PINGUET (Mle A.) (F.F)	C.E.S. analyse appliquée au contrôle des médicaments, Section Physico-Chimie
POULLAIN P.	C.E.S Hématologie
POUSSET J.-L. (F.F.)	C.E.S. Pharmacotechnie chimique et galénique
PRAT (Mme M.-T.) (F.F.)	Mathématiques
RAYNAUD G.	Anatomie et histologie
RIVET J.	Physique
ROLLEN (Mle A.)	Botanique
ROBERT (Mme M.)	C.E.S Immunologie Générale et Appliquée
SEILLER (Mme M.) (F.F.)	Pharmacie Galenique Industrielle
THUONG CONG TRIEU (F.F)	Chimie analytique
YONGER J.	Chimie analytique

B I B L I O T H E Q U E

RUYSSEN (Mle Y.)	Conservateur en Chef, chargé de la Direction
LAVAUD (Mle S.)	Conservateur

DESGRIPPES (Mme A.) ..... Conservateur

BOUYRESSE (Mlle A.-M.) ..... Bibliothécaire

A V A N T - P R O P O S

-:-:-:-:-:-:-

A Monsieur le Professeur TRUHAUT qui, après nous avoir donné le sujet de cette thèse, a bien voulu diriger nos travaux, et nous faire l'honneur de présider le jury, nous exprimons notre profonde gratitude.

Notre reconnaissance va également.

A Monsieur le Professeur R. PARIS qui a accepté de faire partie de ce jury.

A Monsieur le Professeur G. LE MOAN qui, en sa qualité de toxicologue a bien voulu s'intéresser à notre travail.

Monsieur BUSTARRET, Directeur Général de l'I.N.R.A., nous a accueillie au Laboratoire de Phytopharmacie, et nous a permis d'entreprendre et d'achever ces travaux. Qu'il trouve ici le témoignage de notre respectueuse et profonde gratitude.

Nos remercîments vont encore,

A Monsieur DROUINEAU, Inspecteur Général de l'I.N.R.A.

A Monsieur G. VIEL, Directeur du Laboratoire de Phytopharmacie de l'I.N.R.A., qui nous a aidée de ses conseils en maintes occasions.

A Monsieur J. GIBAN, Directeur du Laboratoire des Petits Vertébrés de l'I.N.R.A. pour l'intérêt qu'il a porté à la partie agronomique de cette thèse.

Enfin à tous ceux qui nous ont apporté leur aide au cours de la réalisation de ce travail.

-:-:-:-:-:-:-:-

INTRODUCTION

L'utilisation de substances chimiques pour assurer la protection des plantes et des récoltes contre les maladies, les insectes et divers déprédateurs est fort ancienne et l'historien peut retrouver certaines formules empiriques employées dès l'Antiquité. Plus tard sous Louis XIV la nicotine fut employée par la Quintinie pour lutter contre les pucerons. Mais c'est sans doute à Benedict PREVOST en I808, qu'est due la première véritable étude scientifique, sur les propriétés anticryptogamiques du sulfate de cuivre.

Au cours du XIX° siècle, les cultures subirent à plusieurs reprises, de graves invasions de parasites, et les agronomes de l'époque eurent recours à l'application de produits chimiques. C'est ainsi que pour lutter contre le mildiou, l'emploi de la bouillie sulfocalcique fut préconisé par GRISON en I852 (39), puis celui de la bouillie bordelaise par MILLARDET en I885 (75).

Plus tard, les cultures de pomme de terre attaquées par le Doryphore, furent protégées grâce aux traitements par l'acétoarsénite de cuivre, puis par l'arséniate de chaux.

Jusqu'en I937 on peut noter une nette prédominance des composés minéraux parmi les nombreuses substances préconisées pour le traitement antiparasitaire des plantes. Ce n'est qu'au cours de la seconde guerre mondiale qu'apparurent les premiers composés organiques. Leur fabrication relativement peu onéreuse au moyen de synthèses assez simples,

permettait leur emploi en agriculture, De plus, ces substances (DDT - HCH - parathion-etc...) ouvraient des perspectives de lutte efficace à l'égard de certains ravageurs, contre lesquels l'agriculteur ne possèdait pas, ou peu de moyens de défense. Une nouvelle voie était donc ouverte, et il n'y a pas lieu de s'étonner si depuis lors, la liste des produits de synthèse utilisés comme insecticides, fongicides, herbicides, n'a cessé de croître.

Cependant l'emploi de plus en plus répandu de ces substances pose certains problèmes d'une importance considérable. En effet si les pesticides permettent de lutter efficacement contre les insectes, les champignons inférieurs et les mauvaises herbes, la plupart d'entre eux sont également toxiques pour l'homme et les animaux. Très rapidement est donc apparue la nécessité d'évaluer et de confronter deux aspects de la lutte chimique. D'une part les avantages certains qu'apporte l'emploi des pesticides sans lequel la production agricole supporterait des pertes importantes, et d'autre part les risques de nocivité qui résultent des propriétés toxiques pour l'homme, que possèdent beaucoup de ces substances.

RAUCOURT (20 - 21 - 98 - 99) avant 1940, avait déjà effectué d'intéressants travaux sur les répercussions toxicologiques de l'emploi des arsenicaux. Mais c'est à FABRE, TRUHAUT et VIEL (33) que l'on doit la publication en 1954 de la première étude générale française précisant les différents aspects des risques de toxicité. FABRE et TRUHAUT ont fait paraître, la même année, un ouvrage sur la Toxicologie des produits phytopharmaceutiques (32)

Depuis cette époque, TRUHAUT, dans divers articles, seul ou en collaboration avec FABRE ou VIEL (109 - 110 - 111 - 112 - 113 - 114 - 34 - 116) ainsi que par sa participation à une série de rapports de Comités mixtes FAO/OMS (93 - 94 - 95 - 96 - 97), ou du Conseil de l'Europe (89), n'a cessé d'attirer l'attention sur les problèmes de santé publique posés par l'emploi des pesticides en Agriculture, et sur la nécessité d'évaluer les risques de toxicité, notamment ceux à long terme,

pouvant en résulter, ce qui conditionne les mesures de prévention, soit pour les manipulateurs chargés de l'épandage, soit pour les consommateurs des denrées alimentaires traitées.

Les études sur les pesticides exigent la collaboration de spécialistes de différentes disciplines. Chimistes et agronomes assurent la mise au point des substances nouvelles. Ils en déterminent l'efficacité et en définissent les conditions d'emploi optimales. Mais par ailleurs, c'est aux toxicologues qu'incombe la tâche d'étudier la nocivité de ces produits, pour l'homme et les animaux supérieurs. Ils doivent alors rassembler un très grand nombre de données expérimentales afin de pouvoir définir les règles dont l'application stricte permettra finalement de n'utiliser les pesticides qu'avec des risques très minimes. Ces données concernent non seulement la toxicité aigüe, mais également les effets des petites doses répétées à longue échéance, car il s'agit non seulement d'éviter les accidents chez les utilisateurs, mais aussi de protéger les consommateurs des plantes traitées, contre les risques d'intoxication chronique.

Les études toxicologiques doivent porter également sur les animaux sauvages qui sont encore plus menacés que l'homme par les traitements pesticides.

L'ensemble de ces recherches peut être classé en trois grands groupes :

I°) Etudes de toxicologie biologique comprenant les essais de toxicité aigüe, à court terme et à long terme par différentes voies d'absorption, chez plusieurs espèces animales. Elles aboutissent à l'évaluation quantitative de la toxicité d'un produit. Elles doivent s'accompagner d'examens histologiques indispensables pour révèler certaines lèsions morphologiques et en particulier les effets cancérogènes.

2°) Etudes physico-chimiques permettant de suivre la localisation des produits dans l'organisme, leur transformation éventuelle en

métabolites, leurs vitesses d'élimination et leurs rythmes de défixation.

3°) Détermination des concentrations de pesticides, non seulement dans les denrées alimentaires, mais aussi dans les atmosphères, les eaux et les sols, afin d'évaluer le taux de contamination du milieu environnant, et d'en déduire les risques pour l'homme et les animaux.

Lorsqu' après avoir obtenu notre diplôme de pharmacien, nous avons été agréée parmi le personnel scientifique du laboratoire de Phytopharmacie de l'I.N.R.A., M. le Professeur TRUHAUT,qui depuis de nombreuses années s'est attaché à établir une étroite liaison entre les tenants des disciplines agronomiques et les toxicologues,en ce qui concerne les études sur les pesticides, a attiré notre attention sur certains problèmes toxicologiques restant posés par l'un des pesticides les plus anciennement connus, le DINITRO - 4 - 6 - O - CRESOL ou DNOC. Ce composé utilisé pour ses propriétés herbicides, insecticides et fongicides possède une toxicité certaine, et il a été dans plusieurs pays, à l'origine de nombreuses intoxications souvent mortelles.

Si un certain nombre de recherches ont été faites sur la détermination de la toxicité proprement dite du DNOC et le mode d'action de ce composé, beaucoup plus rares sont les travaux qui ont porté sur l'étude de ses transformations dans l'organisme. Il y avait donc un grand intérêt à entreprendre une étude approfondie du métabolisme du DNOC. D'une part, comme l'a montré TRUHAUT (IO8 -II5), la connaissance des transformations dans l'organisme d'un composé toxique comme le DNOC, permet d'approfondir le mécanisme et l'orientation de sa toxicité. D'autre part elle facilite beaucoup l'expertise chimique dans le cas des intoxications. Le toxicologue sait ainsi quel métabolite il doit rechercher dans tel ou tel tissu de l'organisme.

Ces renseignements peuvent donc être précieux, tout d'abord dans le cas d'intoxications accidentelles chez les ouvriers qui manipulent ce produit. Mais ils intéressent également les vétérinaires et les agronomes chargés de protéger les animaux domestiques et le gibier contre

les risques d'intoxications par les pesticides. Des mortalités de lièvres ayant été signalées après des traitements herbicides par le DNOC, nous avons été amenée à étudier dnas quelles conditions de tels accidents pouvaient se reproduire. La mise en évidence des intoxications reposant essentiellement sur l'analyse toxicologique, il importait donc de pouvoir identifier et doser le DNOC dans les organes aussi bien sous sa forme primitive qu'à l'état de métabolites.

C'est pourquoi nous avons entrepris d'étudier le métabolisme du DNOC chez le lapin, puis d'appliquer ces résultats à l'étude des intoxications de lièvres consécutives aux traitements herbicides par le DNOC.

M. le Professeur TRUHAUT a bien voulu diriger nos recherches, et M. VIEL Directeur du Laboratoire de Phytopharmacie nous a constamment aidée de ses conseils.

L'ensemble de notre travail sera présenté selon le plan suivant ;

P L A N

PREMIERE PARTIE

Revue des propriétés générales, physiques, chimiques et biologiques du DNOC, comportant un exposé synthètique sur sa toxicologie analytique et biologique.

DEUXIEME PARTIE

Mise au point d'une méthode d'analyse applicable au dosage du Dinitro 4 - 6 - O - crésol et de ses métabolites, dans les milieux biologiques d'origine animale ou végétale, et comportant les deux parties suivantes :

I°) Caractérisation et dosage des composés à l'état pur

- Dinitro - 4 - 6 - O - crésol
- Amino 6 - nitro 4 - O - crésol
- Amino 4 - nitro 6 - O - crésol
- Diamino - 4 - 6 - O - crésol

2°) Caractérisation et dosage de ces composés à partir des milieux biologiques

- Urine
- Sang
- Organes
- Tissus végétaux

TROISIEME PARTIE

Etude du métabolisme du DNOC chez le lapin, portant sur les points suivants :

- Concentrations du DNOC et de ses métabolites dans le sang.
- Concentrations du DNOC et de ses métabolites dans l'urine.
- Relations entre l'évolution des concentrations sanguines et l'élimination urinaire du DNOC.
- Recherche du DNOC et de ses métabolites dans les fèces.
- Concentrations du DNOC et de ses métabolites dans les principaux organes.
- Transformations du DNOC et de ses métabolites au cours de la putréfaction des tissus.

QUATRIEME PARTIE

Etudes de toxicologie agronomique relatives à certaines applications du DNOC en agriculture :

1°) Détermination des résidus de DNOC sur blé lors des traitements de plein champ, en rapport avec les risques d'intoxication pour les lièvres.

2°) Analyse des lièvres après intoxication expérimentale par le DNOC.

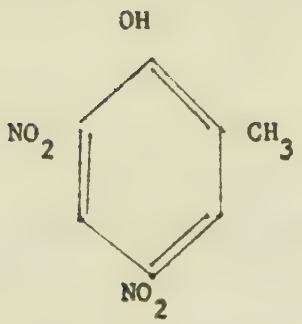
CINQUIEME PARTIE

Conclusions générales.

PREMIERE PARTIE

REVUE DES PROPRIETES GENERALES DU DINITROORTHOCRESOL

FORMULE



DENOMINATION

Dinitro 4 - 6 - ortho crésol

ou Methyl 2 - dinitro 4 - 6 phénol

ou Dinitro 2 - 4 - O - crésol

ou encore Dinitro 3 - 5 - O - crésol si l'on numérote en I le radical methyle.

La dénomination la plus conforme à la règlementaion internationale est Dinitro 2 - 4 - O - crésol, puisque d'une part la fonction prin-

cipale, l'hydroxyle phénolique, est placée en I, et d'autre part la somme des numéros des substituants est plus faible que dans les autres formules.

Mais en fait, c'est le terme Dinitro 4 - 6 - O - crésol que l'on rencontre le plus frêquemment dans la bibliographie.

Le nom commun adopté par l'A.F.N.O.R. est DNOC

POIDS MOLECULAIRE

I98,I3

PREPARATION

Le DNOC est préparé par sulfo-nitration de l'ortho crésol

PROPRIETES PHYSIQUES

- Le DNOC se présente sous forme d'une poudre jaune cristallisée
- Son point de fusion est 85,8°c
- Sa tension de vapeur est de 5,2 X IO-5 mm de mercure à 25°c.

  Il est entraînable à la vapeur d'eau en milieu acide.
- Solubilités
  - eau distillée : très peu soluble
  - acétone I00,6g dans I00 ml de solvant à I5°c
  - benzène 37,5 g " "
  - étrachlorure 2,4 g " "
    de carbone
  - chloroforme 37,2 g dans I00 ml de solvant à I5 °c
  - éther 9,I2 g " "
  - éthanol 4,3 g " "
    "

- acide acétique 23,45 g dans I00 ml de solvant à I5°C
- méthanol 7,3 g " "
- éther de pétrole 0,5I g " "
- le DNOC est également soluble dans les lipides

PROPRIETES CHIMIQUES.

I°) - Propriétés dues à l'hydroxyle phénolique.

L'hydroxyle phénolique confère une certaine acidité au DNOC, qui se trouve renforcée du fait de la présence des deux groupements NO_2 fortement électronégatifs (TRUHAUT) (35). Par action des bases, on obtient des crésolates fortement colorés et solubles dans l'eau.

2°) - Propriétés dues au noyau dinitré.

a) - Les groupements NO_2 peuvent être réduits partiellement ou totalement suivant la force du réducteur utilisé. Le sulfhydrate d'ammonium transforme le DNOC en amino-6-nitro-4-o-crésol (CAZENEUVE) (I9) tandis que le zinc en milieu sulfurique permet la réduction complète en diamino-4-6-o-crésol.

b) - La présence de deux groupements NO_2 en meta permet au DNOC de réagir avec les cétones en milieu alcalin comme le meta-dinitrobenzène en donnant des composés de nature quinoïde (FABRE) (30).

EMPLOIS DU DNOC.

L'utilisation du DNOC a été importante et variée au cours de ces

.../...

quatre vingts dernières années.

Dès la fin du siècle dernier, on l'employait pour ses propriétés colorantes sous le nom de jaune VICTORIA. On l'utilisait même à colorer le beurre jusqu'au jour où WEYL (II9) en I887, protesta contre cet usage en révélant pour la première fois les propriétés toxiques de ce produit.

En I892, on découvrit ses propriétés insecticides et fongicides. Il fut alors employé pour la lutte contre Lymantria monacha et pour le traitement des bois contre Merulius lacrymans.

Pendant la première guerre mondiale les dérivés nitrés des phénols, dont le DNOC, eurent leurs applications en tant qu'explosifs. C'est à partir de ce moment-là que les premières intoxications furent signalées dans les poudreries, et l'étude toxicologique des nitrophénols fut entreprise par GUERBET en I9I8 (40) puis par MAGNE, MEYER et PLANTEFOL en I932 (69).

A la suite de ces travaux, les américains CUTTING, MEHRTENS et TAINTER (24) eurent l'idée d'introduire le dinitrophénol et le dinitro-o-crésol en pharmacologie en utilisant leurs propriétés amaigrissantes.

Ces médicaments furent très utilisés entre les deux guerres mais les abus entraînèrent de nombreux accidents parfois mortels. Actuellement cette thérapeutique de l'obésité est presque abandonnée.

C'est en I934 que TRUFFAUT et PASTAC (I07) proposèrent le dinitro-4-6-o-crésol comme désherbant pour la destruction des sanves dans les champs de blé, d'avoine et de lin.

.../...

L'utilisation du DNOC en agriculture s'est alors amplifiée. Actuellement il est couramment employé d'une part pour le désherbage des céréales, et d'autre part pour le traitement insecticide et fongicide des arbres fruitiers pendant l'hiver. Notons qu'il est également utilisé dans la lutte contre les Acridiens grands migrateurs.

ETIOLOGIE DES INTOXICATIONS

Les dinitrophénols ont été à l'origine de nombreuses intoxications mortelles. Ils furent parfois utilisés dans un but de suicide (DUQUENOIS)(27) et d'autre part l'utilisation inconsidérée en thérapeutique de l'obèsité a pu entraîner des accidents.

Mais ce sont surtout lors des utilisations professionnelles que les intoxications se produisent le plus fréquemment, chez les ouvriers travaillant dans les usines de fabrication et chez ceux qui effectuent les pulvérisations dans les champs. Depuis la dernière guerre mondiale, de nombreuses intoxications ont été signalées dans divers pays.

- En Grande Bretagne, STEER en I95I (I03) pratiqua l'autopsie d'un ouvrier dont la mort était survenue au cours de pulvérisations avec le DNOC.

RIDSTRUP en I95I (8) relata huit cas fatals d'intoxications. En I952, il signala que chez 23 ouvriers fabricants et I33 pulvérisateurs en observation, il s'était produit quatre cas graves d'intoxication par le DNOC.

- Aux Pays-Bas, plusieurs empoisonnments se produisirent en I946 relatés par VAN LUIJT (68) notamment deux cas d'intoxication mortelle qui se produisirent chez des ouvriers travaillant dans une usine de fabrication de DNOC.

- En Belgique HEYNDRICKX en I962 (49) et en I964 (50) eut à pratiquer l'analyse toxicologique du corps de deux cultivateurs intoxiqués mortellement lors de pulvérisations avec le DNOC.

-En Argentine, CORTI (23) en I953 observa chez les ouvriers les symptômes d'intoxication par le DNOC. Un cas se termina par une issue fatale.

Tous ces accidents ont incité les chercheurs à poursuivre l'étude toxicologique du DNOC.

TOXICITE

I°) Toxicité par voie orale

a) Toxicité aigüe

- Pour l'homme, la dose mortelle est estimée à 29 mg/kg d'après DIDSTRUP (I952) (I0).

- Pour différentes espèces ,

Le tableau annexe donne les valeurs des DL 50 et DL I00 pour différentes espèces animales.

TABLEAU I TOXICITE DU DNOC POUR DIFFERENTES ESPECES ANIMALES

Voie d'administration	DL 50 mg/kg	DL 100 mg/kg	Dose mortelle mg/kg	REFERENCES
S - C	24,2			PARKER V - H (79)
I - P	24			LAWFORD DJ - (6I)
				(5)
orale		50		SPENCER,H.V (I02)
	26			LEHMAN, A.J (63)
	28			BROWN, A.W.A (I5)
		40		AMBROSE, A.M (2)
S - C	24,6			PARKER, V.H 79)
I - P	28,5			LAWFORD DJ - KING,E et HARVEY,D.G (5I)
Cutanée		500		SPENCER, HV (502)
I - P	22,5			LAWFORD,DJ - KING,E et HARVEY,D.G (6I)
I - P	23,5			LAWFORD,Dj - KING,E et HARVEY D.G(6I)
orale	I00			AMBROSE,A.M (2)
S --C	50			AMBROSE,A.M (2)
I - M			5	HEYMANS,C (48)
I - P			IO	"
I - V			I5	"
I - M			5	AMBROSE,A.M (2)

- Les rongeurs : lapins, cobayes, rats, souris, ont dans l'ensemble des sensibilités au DNOC assez voisines.

- Les ruminants sont plus résistants. HARVEY en I958 a montré(47) que chez les chèvres, de petites quantités de DNOC étaient très rapidement et complètement détruites par le rumen. Après administration par voie orale, de IO mg/kg de DNOC à des chèvres, des moutons et des veaux, il a observé que la concentration dans le sang était très faible et correspondait à celle que provoque une injection intra-péritonéale de I mg/kg.

- Les poissons sont très sensibles à l'action du DNOC.D'après LECLERC (62) les concentrations létales sont de I,5 à 2 ppm dans l'eau distillée et de 3 à 4 ppm dans l'eau de rivière.

En I953 GIBAN (38) a étudié la toxicité comparée des sels de sodium de baryum et de calcium du DNOC à l'égard du Vairon.Il n'a pas constaté de différence importante de toxicité entre ces trois composés. Mais il a observé qu'en présence de sels de calcium dans une solution à un pH voisin de 7, le vairon résistait mieux à l'action du DNOC. Dans l'eau distillée, dix vairons sur dix sont morts à 0,22 mg/l de dinitro crésolate de sodium. Mais dans l'eau ordinaire (I45 mg/l de sels de calcium exprimés en Ca O), un vairon sur dix n'a succombé qu'à la suite d'une immersion pendant 30 mn dans une solution à IO mg/l de dinitro crésolate de sodium.

Chez les canetons, SPENCER (I02) a provoqué des cataractes chez IOO % des animaux en les nourrissant pendant 24 heures avec un régime contenant 0,25 % de DNOC.

b) Toxicité sub-aigue

Chez l'homme le DNOC agit comme un poison cumulatif.

D'après BIDSTRUP (IO) des concentrations de 5 ppm de DNOC supportées pendant plusieurs semaines peuvent avoir une issue fatale.

HARVEY en I95I (45) réalisa l'expérience suivante : 75 mg par jour de DNOC ont été administrés par voie orale à des volontaires humains pendant 5 à 7 jours. Après le troisième jour, il a observé de hautes concentrations temporaires de DNOC dans le sang des sujets, accompagnées de symptômes d'intoxication : lassitude, malaise, maux de tête.

En I953 KING et HARVEY (57) reprirent la question. Ils comparèrent les vitesses d'élimination du DNOC chez l'homme, le rat et le lapin. Ils constatèrent que c'est l'homme qui élimine le plus lentement tandis que chez le lapin on ne trouve plus de DNOC dans le sang au bout de 2 jours, chez le rat le DNOC disparaît en 8 jours et chez l'homme en 38 jours. Les auteurs ont suggeré que le DNOC pourrait être stocké chez l'homme dans les liquides extra-cellulaires.

Chez les animaux de laboratoire l'action cumulative est beaucoup moins nette.

PARKER (79) en I95I soumit des rats à un régime contenant 200 ppm de DNOC, pendant plusieurs semaines. Il n'observa aucun symptôme d'intoxication.

Par ailleurs il administra à des chiens 5 à I0 mg/kg de DNOC pendant douze jours successifs. Aucune action cumulative n'a été observée.

Sur rats également des essais de toxicité chronique ont été effectués par SPENCER (I02) sur une durée de six mois, avec des concentrations de DNOC dans le régime allant de 20 à I000 ppm.

Avec 20, 50 et I00 ppm, aucun signe d'intoxication n'a été observé.

Avec 200 ppm, les animaux ont subi une perte de poids de 7 à 9%

Avec 500 ppm, la perte de poids était très élevée et le taux d'urée dans le plasma augmenté.

Avec IOOO ppm des morts ont été observées au bout de IO jours et le taux d'urée dans le plasma était très élevé.

Chez la chèvre d'après BROWN (I95I) (I5) , 50 mg/kg par jour ont été supportés pendant cinq jours sans l'apparition d'aucun symptôme d'intoxication.

Toutes ces données tendent à prouver que l'action cumulative de petites doses répétées de DNOC est beaucoup plus faible chez les animaux de laboratoire que chez l'homme. (BARNES) (5).

2°) Toxicité par voie cutanée

SPENCER(I02) a montré que le cobaye pouvait tolérer jusqu'à 200 mg/kg de DNOC, en application sur la peau rasée, et que la dose minimum mortelle était de 500 mg/kg. Par ailleurs une solution à 3 % dans l'alcool s'est montrée plus nocive qu'une solution huileuse à 5 % en application sur la peau rasée du lapin.

En I953 KING (58) a étudié les effets de la pénétration cutanée du DNOC chez le lapin. Il a constaté qu'une heure après l'application d'une dose de 2 mg/cm^2 sur 50 cm^2 de DNOC en solution aqueuse, la moyenne des concentrations dans le sang était inférieure à IO µg/g et variait peu pendant deux autres heures. Une deuxième application effectuée alors, provoquait une forte hausse des concentrations.

Par ailleurs il ressort de cette étude que la peau peut se comporter comme un réservoir de DNOC. En effet 48 heures après l'application cutanée, le taux dans le sang s'était relevé de 2,4 à 7,9 µg/g.

Il a été démontré (HARVEY) (45) que chez l'homme également de petites quantités de DNOC pouvaient être absorbées à partir d'une solution aqueuse à 2 %, appliquée sur la peau.

3°) Toxicité par voie pulmonaire

Les expériences de KING (58) sur rats ont montré qu'une inhalation de DNOC par aérosol était particulièrement dangereuse, et pouvait provoquer la mort. Les particules de DNOC étant directement transportées par l'air à la surface des poumons, le DNOC gagne rapidement toutes les parties du corps sans avoir à franchir la barrière hépatique.

Après une exposition de 4 heures à une concentration de 100mg/m3 de DNOC à une température de 28 à 30°, le taux du DNOC dans le sang des rats variait de 16 à 64µg/g suivant les individus. Vingt heures plus tard ces valeurs avaient diminué considérablement, mais il y avait une augmentation de la température et du rythme respiratoire chez les animaux. Tandis que les concentrations dans le sang diminuaient, les effets du DNOC sur le métabolisme continuaient donc à s'intensifier.

SYMPTOMES D'INTOXICATION

1°) Dans le cas de l'intoxication aigüe

a) Chez les animaux: rats, souris, lapins, chiens.

D'après PARKER (79) 10 à 15 mn après une injection sous cutanée de DNOC la respiration commence à s'accélérer. 15 mn plus tard l'animal devient prostré. Si la dose n'est pas mortelle, l'état de prostration dure 1 à 2 heures. Puis peu à peu l'animal redevient actif. Au bout de 18 heures il a retrouvé son état normal.

Si la dose est mortelle, la respiration continue à s'accélérer après la prostration de l'animal. Des convulsions précèdent parfois la mort. La rigidité musculaire commence juste avant la mort et persiste quelques heures après.

A l'autopsie on note une intense congestion et un léger oedème des poumons, des variations du taux de glycogène dans le foie, la présence de protéines dans le filtrat glomérulaire des reins.

b) Chez l'homme

Les symptômes observés lors des accidents relatés par les différents auteurs sont toujours les mêmes (Van LUIJT (68), POLLARD (92) BIDSTRUP (9), CORTI (23), HEYNDRICKX (50) : Nausées, agitation, hyperthermie, rougissement de la peau, sueurs, soif intense, respiration rapide, cyanose et collapsus.

On note une forte augmentation du métabolisme basal, jusqu'à quatre fois sa valeur normale, une excrétion d'azote très importante et l'élévation du taux de l'urée dans le sang.

L'évolution de l'intoxication est très rapide, le décès peut survenir en 24 à 48 heures.

La mort est accompagnée d'une rigidité cadavérique très forte.

2°) Dans les intoxications sub-aigües

Chez l'homme

(BIDSTRUP) (8 - 9), on observe de la fatigue, une sudation excessive, une soif intense, et une perte de poids. Les premiers signes de l'intoxication sont une sensation anormale de bien-être. Cette euphorie indique la nécessité d'arrêter l'exposition du sujet du DNOC.

MODE D'ACTION DU DNOC

Au début de l'utilisation des dinitrophénols en thérapeutique, on pensait - (DODDS) (26) que les propriétés amaigrissantes de ces composés étaient dues à une activation de la thyroïdine.Mais depuis des recherches récentes, l'action du DNOC s'explique par un tout autre mécanisme.

Le DNOC, comme le dinitro - 2 - 4 - phénol agit au niveau des combustions cellulaires en provoquant une augmentation de la consommation d'oxygène (TRUHAUT)(83) . Ce mode d'action repose sur l'inhibition de la phosphorylation (LOVE)(50) (LOVE),(22) HUNTER (52),JUDAH (56), BRODY (I4), DIANZANI (25), PARKER (82), ils ont la propriété de stimuler l'activité de l'adénosinetriphosphatase, ou A.T Pase (MYERS (76), PARKER (83), enzyme responsable du clivage de l'acide adénosine triphosphorique ou A.T.P. en acide adénosine diphosphorique ou A.D.P.et en acide orthophosphorique. D'après ENNOR (28) le DNOC inhiberait par ailleurs la créatine-phosphokinase, enzyme qui intervient dans la synthèse de l'A.T.P. à partir de l'A.D.P. et de la phosphocréatine.

Il en résulte que les dinitrophénols ont pour effet de diminuer,dans les tissus,le taux des composés organophosphorés à liaisons p riches en énergie tel que l'A.T.P. (STONER)(104), (JUDAH) (56), (PARKER) (8I) et d'augmenter parallélement la concentration en acide adénylique et en phosphates minéraux.Or l'A.T.P. représente à la suite de nombreuses réactions biochimiques l'énergie chimique enclose dans la molécule de glucides (P.FLEURY et J. COURTOIS) (36). La destruction de l'A.T.P. empêche l'utilisation par l'organisme de l'énergie produite par l'oxydation des glucides. Il y a un déséquilibre entre les processus d'oxydation et les processus de phosphorylation qui sont étroitement liés. Faute d'être transformée en une forme utilisable pour des synthèses biochimiques, cette énergie se dissipe en chaleur (PARKER) (79). Ce mécanisme explique les propriétés hyperthermisantes et amaigrissantes du DNOC.

Il est d'ailleurs à remarquer que la présence d'un groupement NO_2 en para est nécessaire pour que l'action hyperthermisante se manifeste. Les 2 - 4 et 3 - 4 dinitrophénols sont hyperthermisants tandis que les isomères 3 - 6 et 2 - 5 sont hypothermisants (TRUHAUT) (35).

D'autre part on sait que l'A.T.P. joue un rôle primordial dans la contraction musculaire (P.FLEURY et J.COURTOIS) (36). Lorsque l'action de l'A T pase est stimulée sous l'action des dinitrophénols, la diminution conséquente de l'A T P au profit de l'acide adénylique entraîne la rigité musculaire, que l'on peut observer immédiatement après la mort des animaux empoisonnés.

TRAITEMENT DES INTOXICATIONS

L'intoxication par les dinitrophénols se traduisant par un appauvrissement en glycogène du foie, il est conseillé d'administrer du soluté glucosé (TRUHAUT) (35).L'absorption de boissons glacées est recommandée pour lutter contre l'hyperthermie et la deshydratation.

Pour abaisser le métabolisme basal, l'administration de méthylthiouracile a été proposée. Enfin l'injection d'A T P pourrait permettre de compenser les pertes de ce produit subies par l'organisme sous l'action du DNOC (TRUHAUT) (35).

PROPRIETES DU DNOC UTILISEES EN AGRICULTURE

Le DNOC possède des propriétés herbicides, insecticides et secondairement fongicides.

I°) Propriétés herbicides du DNOC

Le DNOC exerce une action phytotoxique sur de nombreuses plantes appartenant à différentes familles, mais il n'agit pas sur les graminées qui sont pourvues d'une cuticule cireuse protectrice. Il en résulte que le DNOC peut être employé comme désherbant sélectif des céréales. Il permet en effet de détruire toutes les adventices dicotylédones annuelles dès le début de leur végétation (B. THELLOT) (I05)

Dans la pratique, on utilise généralement les sels alcalins du DNOC, sodique ou ammoniacal, qui sont solubles dans l'eau. Les doses d'emploi sont de 2,5 à 7,5 kg/ha de dinitro crésolate d'ammonium (B.THELLOT) (I05)répandus dans un volume de 500 à 600 litres (sauf dans le cas spécial des pulvérisations à bas volume).

Le traitement peut se faire avant ou pendant l'hiver, ou encore très tôt au printemps au stade "3 feuilles" (B. THELLOT) (I05)

PASTAC(84) a fait une étude intéressante sur les rapports entre la constitution chimique et les propriétés herbicides des nitrophénols. Il a constaté que le blocage de l'hydroxyle faisait disparaître l'action herbicide, mais laissait intactes les propriétés insecticides. La présence d'un groupement NO_2 en para de l'hydroxyle est également indispensable à l'action désherbante. Ainsi le 2 - 6 dinitropara-crésol n'est pas herbicide. Enfin si l'on allonge la chaîne latérale placée en (2) on exalte l'activité désherbante.

2°) Propriétés insecticides et acaricides du DNOC

Le DNOC a une phytotoxicité telle qu'aux doses efficaces, il ne peut être appliqué sur les plantes en pleine végétation. C'est pourquoi son emploi se limite au traitement d'hiver des arbres fruitiers pour lutter contre le Pou de San José, les cochenilles rouges du poirier et détruire les oeufs d'Aphis pomi et de Cheimatobie (VIEL)(II8).Les traitem

peuvent être faits avec des bouillies mouillantes à base de dinitro-crésolates de sodium ou d'ammonium, à la dose de 600 g/hl de matière active efficace pour la destruction des espèces précitées.

On utilise également les "huiles jaunes", formulations dans lesquelles les propriétés insecticides du DNOC s'ajoutent à celles des huiles de pétrole. Elles sont très efficaces et leut action est très polyvalente.

La concentration en DNOC efficace sur les oeufs de cheimatobie passe de 600 g/hl à 90 g/hl et pour les oeufs d'Aphis pomi de IIO g/hl à 50 g/hl (VIEL et CHANCOGNE)(II7)Elles ont en plus une certaine action sur les oeufs d'hiver des Araignées rouges.

Une autre application des propriétés insecticides du DNOC est la lutte contre les Acridiens grands migrateurs. On l'a beaucoup employé en Rhodésie, au Tanganyka et au Congo Belge pour la destruction des bandes larvaires et des essaims de criquets nomades, en pulvérisation à la dose de I600 à 2800 g par ha. (MALLAMAIRE) (70).

Chez les insectes comme chez les Mammifères le DNOC provoque une rapide accélération du métabolisme mise en évidence par l'augmentation de la consommation d'oxygène. (LORD K.A.)(67)

3° Propriétés fongicides du DNOC

Le traitement d'hiver des arbres fruitiers par le DNOC en plus de son but insecticide essentiel a un rôle fongicide secondaire.

a) Action sur les mousses, algues et lichens.

En détruisant cette végétation saprophyte le DNOC supprime les abris humides favorables au développement des champignons.

b) Action sur les formes d'hibernation de la tavelure

Le DNOC est employé en lessivage des rameaux de poirier pour détruire les chancres causés par la pénétration du mycélium. On l'utilise aussi pour la destruction des périthèces en aspersion sur les feuilles de pommier tombées (GAUDINEAU) (37).

CONCLUSIONS

Le DNOC apparaît donc comme un produit toxique pouvant agir par voie orale, cutanée et pulmonaire.

Lors des intoxications aigües, des doses de 20 à 30 mg/kg suffisent à provoquer la mort, chez l'homme et chez la plupart des espèces animales.

D'autre part le DNOC agit comme un poison cumulatif chez l'homme, qui n'élimine que très lentement ce composé en 38 jours.

Si l'utilisation du DNOC en thérapeutique amaigrissante est pratiquement abandonnée, par contre son emploi en agriculture est toujours très important. Si les précautions d'hygiène ne sont pas respectées, les ouvriers risquent des contaminations par inhalation et par pénétration cutanée (HOMER) (5I) qui compte-tenu de la toxicité du produit, peuvent avoir de graves conséquences.

Tous ces faits justifient l'entreprise de nouveaux travaux susceptibles d'augmenter nos connaissances toxicologiques sur le DNOC. Nous avons tenté nous-même d'y apporter notre propre contribution.

DEUXIEME PARTIE

MISE AU POINT D'UNE METHODE D'ANALYSE

(40-41-42)

Les travaux de GUERBET de 1918 et de 1932 ont montré que le dinitro-2-4-phénol, composé très voisin du DNOC, était dégradé dans l'organisme en formant essentiellement de l'amino-2-nitro-4-phénol. TRUHAUT (115) précise que la recherche de ce composé dans les urines fut en conséquence, très rapidement exigée par la législation française sur les maladies professionnelles, pour le dépistage des intoxications par le dinitrophénol.

Un peu plus tard MASSON (72) apporta des données quantitatives sur le sort du D.N.P dans l'organisme lors des intoxications aigües et chroniques chez le lapin et chez le rat.

Ce n'est qu'après la guerre que des travaux sur la localisation et l'élimination du DNOC chez différentes espèces, furent entrepris. Mais peu d'études furent faites sur le métabolisme proprement dit de ce composés, si ce n'est le très intéressant travail de SMITH en 1953 (101) qui a réussi à en identifier les principaux métabolites urinaires. Il a démontré que le DNOC se transformait essentiellement en dérivé monoaminé en ortho, éliminé dans l'urine sous forme de conjugué acétique, l'acétamido-6-nitro-4-o-crésol. A côté de ce composé, les urines contenaient également du DNOC, libre ou conjugué et des traces d'amino-4-nitro-6-o-crésol.

Compte tenu de ces travaux, nous avons entrepris de baser nos recherches sur la détermination quantitative du DNOC lui-même et des deux amino-nitro-o-crésols une fois libérés de leurs combinaisons hydrolysables, en l'appliquant non seulement à l'urine mais aussi au sang et aux différents organes. Nous nous sommes proposé également de voir s'il ne se formerait pas aussi le diamino-4-6-o-crésol. Par ailleurs la partie agronomique de notre travail devait comporter la détermination des résidus de DNOC sur les blés traités, afin d'évaluer les risques qu'ils présentent pour le gibier.

Nous avons donc dû nous efforcer tout d'abord, de mettre au point une méthode d'analyse applicable au dosage du DNOC et de ses métabolites, dans les milieux biologiques d'origine animale ou végétale.

Toute mise au point d'une méthode d'analyse toxicologique comporte trois étapes :

I) - Etudes portant sur la caractérisation et le dosage des composés étudiés à l'état pur.

2) - Recherche des techniques d'isolement de ces composés à partir des milieux biologiques.

3) - Lorsque ces deux étapes sont franchies la méthode peut alors être appliquée à différentes déterminations.

Dans cette deuxième partie de notre travail, nous exposerons donc d'abord les différentes méthodes qui peuvent être utilisées pour la caractérisation et le dosage, à l'état pur :

du DNOC
de l'amino-6-nitro-4-o-crésol
de l'amino-4-nitro-6-o-crésol
du diamino-4-6-o-crésol

Nous étudierons ensuite les techniques d'extraction de ces composés

à partir de différents milieux.

Dans chacun des chapîtres nous nous efforcerons de présenter d'abord une revue des travaux antérieurs, puis de faire un examen critique de ceux-ci, en utilisant notre expérimentation personnelle, ce qui nous conduira au choix et à la mise au point définitifs des techniques qui nous ont paru les plus appropriées aux déterminations que nous nous étions proposé d'entreprendre.

CARACTERISATION ET DOSAGE DU DNOC ET DE SES METABOLITES

CARACTERISATION ET DOSAGE DU DNOC A L'ETAT PUR.

T R A V A U X A N T E R I E U R S

Plusieurs techniques ont été proposées par différents auteurs pour la caractérisation ou le dosage du dinitrophénol ou du dinotro-o-crésol. Elles font appel à la colorimètrie, à la chromatographie ou à la polarographie.

I°) - Méthodes colorimètriques.

a) - Réaction de diazo-copulation dite de "DERRIEN".

Elle fut déjà utilisée par GUERBET (40 - 4I - 42) pour la caractérisation du dinitrophénol et pour différencier l'amino-2-nitro-4-phénol de l'amino-4-nitro-2-phénol.

Principe.

Dans un premier temps le groupement NO_2 placé en ortho de l'hydroxyle est réduit en groupement NH_2 par le chlorure stanneux en milieu ammoniacal.

- le β naphtol en solution ammoniacale est utilisé comme agent de copulation, après diazotation.

- La coloration due à la formation de l'azo β naphtol est extraite par l'éther.

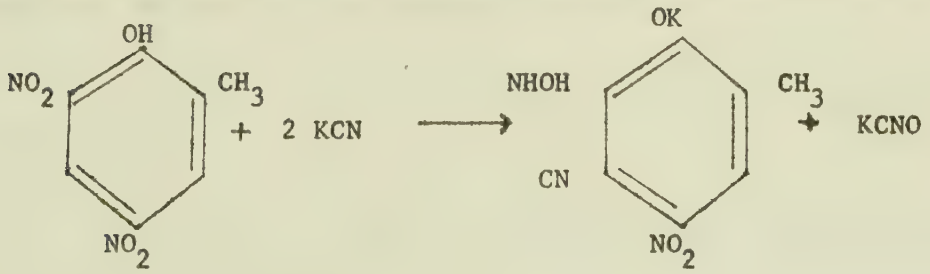
b) - Réaction de LE MITHOUARD (64)

Cette réaction permet de caractériser le dinitrophénol, l'acide picramique et l'acide picrique. Une solution de dinitrophénol mise en contact avec une solution tartique de sulfate ferreux en milieu ammoniacal, provoque la formation d'un anneau rouge à la surface de séparation des deux liquides.

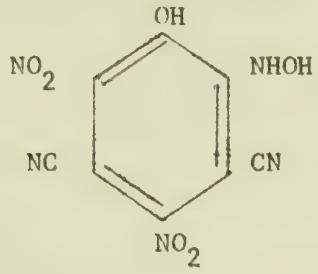
c) - Réaction au cyanure de potassium.

Dès 1865, PFAUNDLER et OPPENHEIMER (91) ont montré que les dérivés polynitrés réagissaient avec le cyanure de potassium en donnant des composés colorés. Etudiée par la suite par d'autres auteurs (BORSCHE (12) et BOCKER puis ANGER (3)) elle a été adaptée à la détermination spectrophotomètrique des composés aromatiques meta dinitrés par CALVIN MENZIE (73).

Le principe en serait le suivant : le cyanure de potassium réagit avec les dérivés meta dinitrés en formant des phényl-hydroxylamines



Notons que c'est une réaction semblable qui est utilisée pour la caractérisation de l'acide cyanhydrique par le réactif picrosodé, et qui aboutit à la formation d'acide isopurpurique (TRUHAUT (35)).



La technique donnée par Calvin MENZIE pour le dosage des dérivés meta dinitrés est la suivante.

I ml de solution éthanolique de dérivé méta dinitré

2 gouttes d'une solution aqueuse de cyanure de potassium à IO %

0,5 ml de I propanol

Chauffer au bain marie bouillant pendant IO mn. Après refroidissement ajuster le volume à I ml avec de l'éthanol.

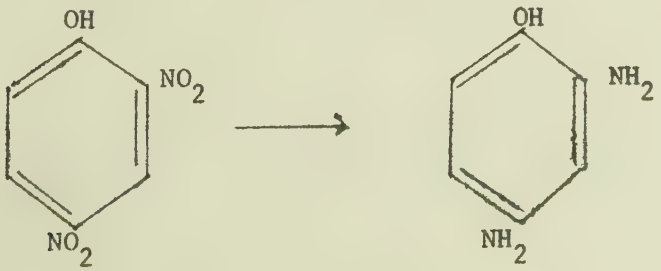
Lire la densité optique au spectrophotomètre à 350 mμ.

d) - Réaction de MEYER.

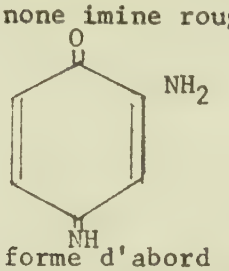
Mise au point par MEYER pour la caractérisation du dinitrophénol et des amino-nitro-phénols, elle fut appliquée à la détection de ces composés dans les tissus organiques par GUERBET (40) par GUERBET et MEYER (42) par MEYER et DRUTEL (74) puis par MASSON (72).

Enfin en I952 PETRASCU (90) l'adapta au dosage du DNOC dans les insecticides.

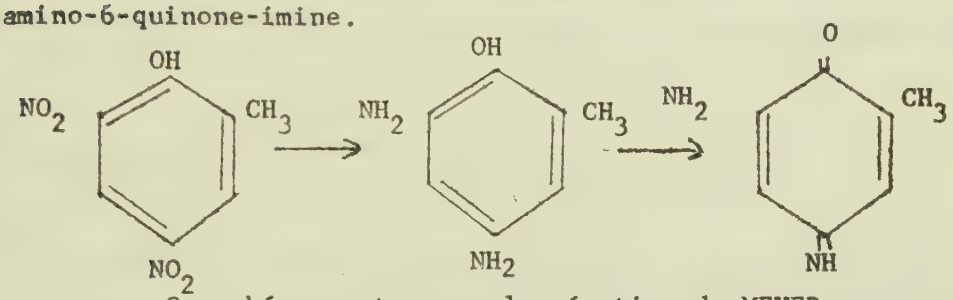
Principe : La réduction par le zinc en milieu acide aboutit à la formation du diamino-phénol.



L'oxydation du diaminophénol par le bichromate de potassium, transforme celui-ci en aminoquinone imine rouge.



Avec le DNOC on forme d'abord le diamino-crésol, puis la méthyl-2-amino-6-quinone-imine.



Ce schéma montre que la réaction de MEYER sera positive aussi bien avec le DNOC qu'avec ses 2 dérivés mono-aminés.

Technique :

La technique primitive proposée par MEYER était la suivante :

IO ml de solution aqueuse de dinitrophénol

2 ml de SO_4H_2 à 20 % en volume

Une pincée de poudre de zinc

Agiter de temps en temps

Après I5 mn filtrer

Ajouter au filtrat III gouttes de solution aqueuse de bichromate de potassium à I°/oo.

Agiter pendant I mn

Puis si nécessaire, ajouter le bichromate de potassium goutte à goutte jusqu'à apparition de la coloration rose.

S'il n'y a pas de dinitrophénol, seule la coloration jaune du bichromate de potassium en excès est observée.

MASSON (72) en I940 adapta cette technique au dosage du dinitrophénol en milieu acétonique en appliquant la méthode de la dilution limite.

En partant de solutions acétoniques de dinitrophénol de concentrations connues, et en appliquant le processus opératoire de MEYER, il détermina la concentration minimale permettant une réaction positive.

La solution de concentration inconnue était alors soumise à des dilutions successives jusqu'à obtention d'une réaction négative. La concentration immédiatement supérieure correspondant à une réaction positive était alors considérée comme la concentration seuil précédemment déterminée.

D'après le taux de dilution opéré, on pouvait calculer la concentration de la solution de dinitrophénol à doser.

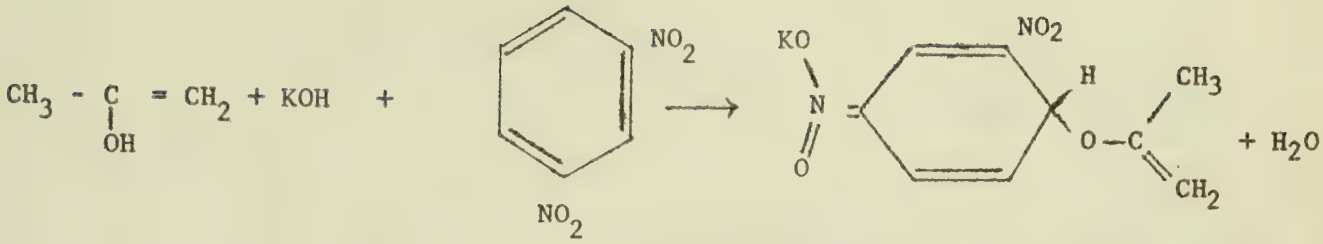
e) - Réaction du groupement meta dinitré - Condensation avec les cétones.

JANOVSKY (54 - 55) en 1886 et en 1891, montra que l'acétone avec un composé nitré en présence de potasse, donnait une réaction colorée. En 1892, BELA Von BITTO étudia plus précisément le cas du meta-dinitrobenzène, en utilisant une série de cétones et d'aldéhydes (6).

Par la suite cette réaction eut de nombreuses applications. En 1933 PERONNET et TRUHAUT (86) l'appliquèrent à la caractérisation de l'acide urique et de certains acides aminés, en particulier de la phényl β alanine. Les composés mis en présence de meta-dinitrobenzène en milieu alcalin donnent des colorations violettes intenses. Ces mêmes auteurs mirent au point une méthode de dosage du benzène après nitration, en utilisant le levulose comme composé à groupement carbonyle.

En 1935 SCHRENK, PEARCE et YANT (100) et FABRE (29) un peu plus tard, recommandèrent l'emploi de la méthyl-éthyl-cétone comme substance carbonylée.

En 1943 BAERSTEIN (4) proposait le mécanisme suivant, pour expliquer l'apparition de ces intenses colorations : les cétones agiraient sous forme énolique, sur les composés meta-dinitrés, en donnant des composés de nature quinoïde colorés.



En 1950 FABRE, TRUHAUT et PERON (30) publièrent une méthode de dosage du benzène et du toluène dans les solvants complexes et les atmosphères, basée sur le même principe ; dans un premier temps, la nitration permet d'obtenir les dérivés nitrés des hydrocarbures aromatiques. Ceux-ci mis en présence de butanone en milieu alcalin donnent une coloration pourpre. Les auteurs ont observé que l'intensité de la coloration dépend de la nature de l'agent alcalin employé. Ainsi avec un mélange de soude et de chlorure de sodium, le benzène donne une coloration vingt-cinq fois plus intense qu'une même quantité de toluène. Par contre avec la potasse, l'intensité de la coloration due au benzène n'est qu'une fois et demie celle due au toluène. C'est sur ce principe que les auteurs ont mis au point la méthode qui permet le dosage simultané du benzène et du toluène. Cette technique devait être présentée par TRUHAUT au Congrès Technique National de Sécurité et d'Hygiène du Travail tenu à Aix-les-Bains en 1950 (31).

En 1949, PARKER (78) étudia l'application de cette réaction au dosage du DNOC en utilisant également la butanone. Il observa que la coloration jaune du dinitrocrésylate de sodium disparaissait de la phase aqueuse pour s'accentuer dans la phase organique. En remplaçant la soude ou la potasse par du carbonate de sodium, la substance colorée était entièrement extraite par la butanone.

C'est cette propriété du DNOC qu'il utilisa pour le dosage de ce composé à partir du sang, des urines et des homogénats de tissus. Non seulement la coloration jaune du DNOC se trouvait accentuée dans la phase cétonique, mais la majeure partie des impuretés interférentes demeuraient dans la phase aqueuse.

La technique mise au point par PARKER est la suivante :

5 ml de solution de DNOC

5 ml de méthyl éthyl cétone

Ajouter I à 2 g d'un mélange de chlorure de sodium (9 parties) et de carbonate de sodium (I partie)

Agiter vigoureusement

Après séparation des deux couches, mesurer la densité optique de la phase cétonique par rapport à la méthyl-éthyl-cétone à 430 mμ

Notons que la méthode adoptée par l'I.U.P.A.C (53) pour le dosage du dinitrophénol et du dinitroorthocrésol dans les atmosphères repose sur le même principe, mais le réactif utilisé est un mélange à volumes égaux de butanone et de cyclohexanone. L'agent alcalin est constitué par une solution de potasse (I00 g dans I00 ml d'eau). Ce même organisme a adopté en I959 une méthode très voisine pour le dosage du trinitrotoluène dans les atmosphères.

f) - Réaction de précipitation avec le NITRON.

Le NITRON ou I-4 diphényl 3-5 endo-anilino-dihydro-triazol, donne avec le DNOC un précipité cristallin.ABELE (I) en I958 a utilisé cette propriété pour isoler et doser le DNOC à partir des tissus animaux. Le précipité de Nitron-crésolate peut être identifié, par sa forme cristalline, sa couleur, son point de fusion (205-207°C) et par son spectre d'absorption qui présente deux maxima l'un à 372 et l'autre à 409 mμ .

2°) - Méthodes chromatographiques.

a) - Chromatographie sur papier.

En I953, SMITH (I0I) utilisa cette méthode pour caractériser le DNOC ainsi que ses différents métabolites. Il proposa plusieurs systèmes de solvants :

Benzène/acide acétique/eau	I/I/2
Benzène/n. butanol/ammoniaque	2/5/2
Butanol/acide acétique/eau	4/I/5

Les révélateurs utilisés étaient les suivants :

- solution d'hydroxyde de sodium 2N
- solution de cyanure de sodium à IO %
- réactifs pour la diazocopulation avec le β naphtol
- solution de nitrate d'argent ammoniacal

Ces deux derniers réactifs permettant de caractériser les dérivés aminés.

En I964, BOGGS (II) indiqua une méthode pour différencier les différents pesticides dinitrés. Deux systèmes de solvants étaient proposés :

Système aqueux :

- phase fixe : éther contenant 5 % d'huile de soja et 2 % d'acide acétique

- phase mobile : méthanol contenant 25 % d'eau et 2 % d'acide acétique.

Système non aqueux :

- phase fixe : éther contenant 4 % de 2 phénoxy-éthanol et 2 % d'acide acétique.

- phase mobile : isooctane contenant 2 % d'acide acétique.

La révélation était réalisée en pulvérisant du méthylate de sodium O,I N ou de la soude O,I N.

Dans ces conditions le Rf obtenu avec le DNOC était de 0,57 dans le cas du système aqueux et de 0,30 dans le cas du système non aqueux.

b) - Chromatographie en phase gazeuse.

BOGGS (II) signale que la chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à capture d'électrons ne convient pas pour la détermination des composés dinitrés.

3°) - Méthode polarographique.

HEYNDRICKX en I962 (49) et en I964 (50) a appliqué la polarographie, à la caractérisation et au dosage du DNOC et du Dinitro-butyl-phénol.

CARACTERISATION ET DOSAGE DU DNOC A L'ETAT PUR.

T R A V A U X P E R S O N N E L S

Nous avons essayé d'appliquer au DNOC la majeure partie des différentes méthodes que nous avons indiquées précèdemment, afin de choisir celle qui s'adapterait le mieux à des déterminations quantitatives.

Nos essais ont été effectués sur un échantillon de DNOC préalablement purifié par cristallisation dans l'alcool.

I°) - Méthodes colorimétriques.

a)- Réaction de diazo-copulation dite de "DERRIEN".

Nous avons essayé d'appliquer cette réaction au DNOC en y apportant quelques modifications pour essayer de la rendre quantitative. En effet la technique adoptée par GOUGET ne permettait que la recherche qualitative du dinitrophénol. D'une part la réduction du groupement NO_2 en ortho de l'hydroxyle n'est que partielle et d'autre part le passage de la coloration dans l'éther rend difficile la mesure de la densité optique au spectrophotomètre, par suite de l'évaporation rapide de ce solvant.

Nous avons d'abord essayé de modifier le mode de réduction. Comme nous le signalons p.47 l'amino-6-nitro-4-O-crésol ne donne pas la réaction de diazocopulation, tandis que son isomère aminé en 4 donne un azoïque très coloré dans les mêmes conditions opératoires. Il fallait donc abandonner la réduction par le chlorure stanneux qui ne touche que le groupement NO_2 en ortho de l'hydroxyle et encore de façon incomplète. Nous avons essayé la réduction totale par le zinc en milieu chlorhydrique de façon à obtenir le diamino-crésol.

Par ailleurs nous avons utilisé un agent copulant susceptible de donner un azoïque soluble dans le milieu même de la réaction. PARKER (80) ayant utilisé la N α naphtyl-éthylène-diamine pour la détermination de l'amino 2-nitro-4-phénol et de l'amino-4-nitro-2-phénol, nous avons essayé d'utiliser ce réactif comme agent de copulation sur le DNOC préalablement réduit et diazoté.

Technique :

A 5 ml de solution de DNOC, sont ajoutés 2 ml d'acide chlorhydrique 5N et une pincée de poudre de zinc (100 à 200 mg)

Après 5 minutes, le liquide est filtré.

3,5 ml de filtrat sont prélevés, y sont ajoutés successivement, 1 ml de solution aqueuse de nitrite de sodium à 0,1 %, puis après 10 mn d'attente à l'obscurité, 1 ml de sulfamate d'ammonium à 1 % dans l'eau, et enfin après 10 autres minutes d'attente, 2 ml de la solution aqueuse de chlorhydrate de N α naphtyl-éthylène-diamine à 0,5 %.

Dans ces conditions, il fallait 40 µg de DNOC pour obtenir une très légère teinte violacée. Nous avons jugé cette sensibilité insuffisante.

b) - Réaction de LE MITHOUARD (64)

Nous avons appliqué cette réaction au DNOC selon la technique décrite par MASSON (72).

Solution de DNOC 2 ml

Ammoniaque à 22° Bé 1 ml

Ajouter avec une pipette au fond du tube à essai, 1 ml d'une solution contenant :

Sulfate ferreux 2 g

Acide tartrique 10 g

Eau qs pour 100 ml

Avec 50 µg de DNOC nous avons ainsi obtenu un anneau rouge orangé très net. Nous avons jugé que cette réaction pourrait être profitablement utilisée pour une caractérisation, mais évidemment elle ne pouvait pas convenir pour une détermination quantitative.

c) - Réaction au cyanure de potassium.

Nous avons appliqué la technique donnée par CALVIN MENZIE (73), mais nous avons constaté qu'avec le matériel courant il était plus commode d'opérer sur un plus grand volume :

5 ml de solution éthanolique de DNOC
4 gouttes de solution aqueuse de cyanure de potassium à 10 %
Chauffage au bain-marie bouillant 15 à 20 mn
Ajustement du volume à 5 ml.

Dans ces conditions, il suffisait de 5 µg de DNOC, pour obtenir une coloration rose, ce qui donnait donc une sensibilité satisfaisante. Mais les intensités de coloration obtenues avec des quantités allant de 5 à 40 µg de DNOC ne suivaient pas d'une façon très satisfaisante la loi de BEER-LAMBERT.

DNOC en µg	Densités optiques à 350mµ par rapport à l'alcool
0	0,022
5	0,060
10	0,110
20	0,167
40	0,292

Par ailleurs lors des répétitions les résultats ne se sont pas montrés suffisamment reproductibles.

d) - Réaction de MEYER.

La technique adoptée par MASSON (72) pour permettre une détermination quantitative a l'inconvénient d'entraîner un temps de tâtonnement plus ou moins long pour la détermination de la dilution limite. Par ailleurs le recours à l'oeil pour apprécier une coloration n'est jamais très précis.

Nous avons donc entrepris d'étudier dans quelles conditions la réaction de MEYER pourrait être adoptée à un dosage spectrophotomètrique plus rapide et plus précis. Cette étude était d'autant plus utile que la technique pourrait être appliquée au dosage des deux amino-nitro-o-crésols.

La méthode décrite au chapître concernant l'amino-6-nitro-4-O-crésol a été appliquée avec succès au DNOC. Dans les conditions opératoires décrites p.48 la coloration suit la loi de BEER-LAMBERT.

DNOC µg	Densités optiques
0	0,004
20	0,057
40	0,II4
60	0,I80
80	0,224

La lecture de la densité optique a été faite par rapport à l'eau distillée à 500 mµ.

Le dosage du DNOC par la réaction de MEYER peut donc être considéré comme une technique valable, bien que n'offrant pas une très grande sensibilité.

e) - Réaction du groupement meta dinitré - Condensation avec les cétones.

Nous avons adopté la technique décrite par PARKER (78) sans y apporter de modifications.

La coloration obtenue suit convenablement la loi de BEER LAMBERT. Les résultats sont reproductibles. La sensibilité est satisfaisante puisqu'elle permet de doser 5 µg de DNOC en valeur absolue.

DNOC µg	Densités optiques
5	0,083
IO	0,I60
20	0,320
30	0,480
40	0,635

Parmi les différentes méthodes colorimétriques étudiées, nous avons donc retenu celle-ci comme la plus intéressante pour le dosage de petites quantités de DNOC.

2°) - Méthodes chromatographiques.

a) - Chromatographie sur papier.

En appliquant la méthode proposée par SMITH (IOI), nous avons obtenu des résultats satisfaisants. Dans ces conditions, 5µg de DNOC donnaient une tâche très nette. Le tableau suivant donne les Rf obtenus avec les différents systèmes de solvants essayés, pour le DNOC, et aussi pour les deux dérivés aminés. Cette méthode était donc intéressante pour la caractérisation des composés étudiés, mais comme nous nous étions proposé de faire des déterminations quantitatives, nous avons finalement retenu les méthodes basées sur des dosages colorimètriques, de préférence à la chromatographie sur papier, essentiellement qualitative ou semi-quantitative.

TABLEAU N° 2

Systèmes de solvants	Rf		
	DNOC	Amino-6-nitro-4-crésol	Amino-4-nitro-6 crésol
I	0,95	0,36	0,84
II	0,93	0,89	0,88
III	0,55	0,20	0,5I
IV	0,39	0,8I	0,92

I - Benzène - acide acétique - eau I/I/2
II - Butanol - acide acétique - eau 4/I/5
III - Benzène - butanol - ammoniaque 2/5/2
IV - Butanol - benzène - eau I/9/IO

b) - Chromatographie en phase gazeuse.

Un essai succinct de chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à capture d'électrons, a confirmé les résultats de BOGGS (II) qui indique que cette technique n'est pas valable pour la détermination des composés dinitrés.

Nous n'avons donc pas poussé plus loin nos investigations.

3°) - Conclusions.

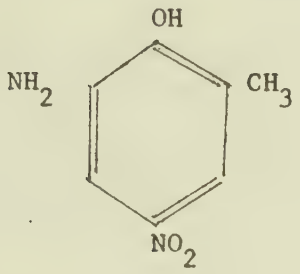
Parmi les différentes techniques que nous avons étudiées, c'est finalement le dosage colorimètrique basé sur la réaction de condensation avec les cétones en milieu alcalin, que nous avons retenu pour le dosage du DNOC.

CARACTERISATION ET DOSAGE DE L'AMINO-6-NITRO 4 - O - CRESOL

T R A V A U X A N T E R I E U R S

I°) - Caractères généraux.

a) - Formule.



b) - Poids moléculaire.

I68,I4

c) - Préparation.

Nous avons préparé nous-même l'amino-6-nitro-4-O-Crésol selon la technique indiquée par CAZENEUVE (19).

Le dinitro-o-crésol est transformé en dinitro-crésolate d'ammonium par saturation avec de l'ammoniaque concentrée.

Le groupement NO_2 en ortho de l'hydroxyle est réduit en NH_2 par ébullition en milieu aqueux en présence d'un excès de sulfhydrate d'ammonium.

- l'excès de sulfhydrate est chassé par ébullition.
- Après refroidissement, la solution est acidifiée avec précaution par l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à précipitation complète de l'amino-6-nitro-4-o-crésol.
- Ce composé est purifié par cristallisation dans le benzène.

Nous avons obtenu ainsi des aiguilles brun rougeâtre et fondant à I65° comme l'indiquait CAZENEUVE.

2°) - Méthodes de caractérisation et de dosage.

Dans la bibliographie on trouve peu de méthodes de dosage de l'amino-6-nitro-4-o-crésol. C'est surtout l'amino-2 nitro-4-phénol qui a fait l'objet de recherches sur les techniques de caractérisation et de dosage, basées sur une réaction de diazocopulation ou sur la réaction de MEYER.

a) - Réaction de diazocopulation (PESEZ et POIRIER (33)).

Par action de l'acide nitreux sur les arylamines primaires, on forme des sels de diazonium. Ces composés peuvent réagir dans certaines conditions sur les phénols ou sur les aryl-amines pour former des hydroxy-azoïques ou des amino-azoïques.

$$Ar - NH_2 \longrightarrow Ar - \overset{+}{N} \equiv N \begin{cases} \xrightarrow{\text{phénol}} Ar - N = N - Ar' - OH \\ \xrightarrow{\text{amine}} Ar - N = N - Ar' - NH_2 \end{cases}$$

Ces azo-dérivés peuvent exister sous forme quinoïde colorée.

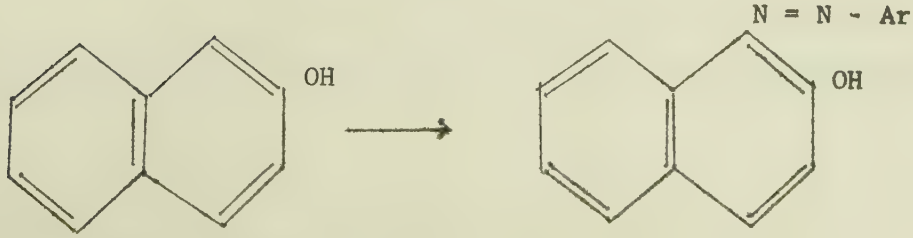
- La diazotation. - se fait par action de l'acide nitreux libéré d'une solution aqueuse de nitrite de sodium, en milieu fortement acide, le sel de diazonium étant généralement instable, on le copule rapidement à froid avec un phénol en solution alcaline, ou une amine, après avoir détruit l'excès d'acide nitreux par le sulfamate d'ammonium. Cette précaution est nécessaire pour éviter les colorations parasites dues à la diazotation de l'amine que l'on copule.

- La copulation. - peut se faire :

I) - avec les phénols

- avec le β naphtol

le reste azoïque se place en α



2) avec les amines

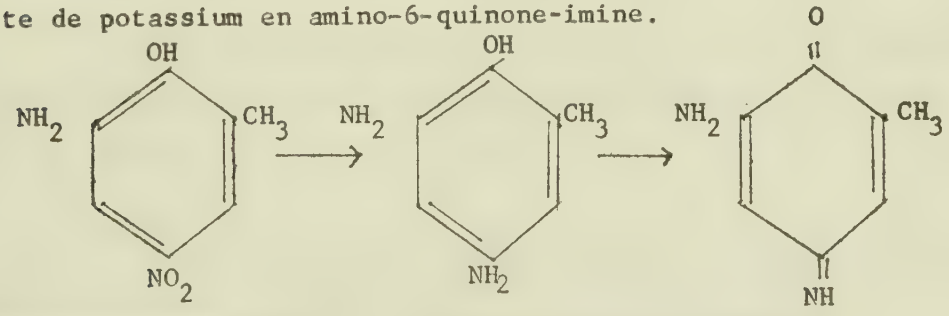
La condensation d'une aryl-amine primaire ou secondaire sur le sel de diazonium s'opère dans un premier temps sur le groupe amine. La diazo-amine se transpose ensuite en amino-azoïque.

$$Ar - N = N - NH - Ar' \longrightarrow Ar - N = N - Ar' NH_2$$

Ainsi TREFOUËL (I06) a-t'il utilisé en I942, la N α naphtyl-I-N diethyl-3-propylène-diamine, comme amine copulatrice des diazoïques des sulfamides.

b) - Réaction de MEYER.

Principe : Comme pour le DNP, la réduction par le zinc en milieu sulfurique conduit au diamino-phénol que l'on oxyde ensuite par le bichromate de potassium en amino-6-quinone-imine.



CARACTERISATION ET DOSAGE DE L'AMINO-6-NITRO-4-O-CRESOL

T R A V A U X P E R S O N N E L S

I°) - Examen critique des Méthodes de caractérisation et de dosage.

a) - Réaction de DIAZO-COPULATION.

En appliquant la technique que nous décrivons p.58 pour le dosage de l'amino-4-nitro-6-o-crésol, nous avons obtenu des résultats tout à fait

différents.

I) - Lors de l'addition de la solution de nitrite de soude, il apparaît une coloration jaune qui ne se produit pas avec l'amino-4-nitro-6-crésol.

2) - La naphtyl-éthylène-diamine fait apparaître une très légère coloration fleur de pêcher à partir de 20 µg d'amino-6-nitro-4-o-crésol. Cette coloration ne peut se prêter à un dosage colorimètrique, car elle ne suit pas d'une façon satisfaisante la loi de BEER et d'autre part la sensibilité de la réaction est insuffisante.

Des essais de condensation avec d'autres agents de copulation comme le β naphtol et la diméthyl α naphtyl-amine ont été également négatifs.

b) - Réaction de MEYER.

Choix du milieu réactionnel

Nous avons d'abord essayé d'opérer en milieu acétonique comme MASSON (72) mais dans ces conditions la coloration obtenue ne suit pas la loi de BEER.

En milieu hydro-alcoolique les résultats sont meilleurs mais présentent quelques irrégularités dans la reproductibilité.

C'est en milieu aqueux que les courbes étalons sont les plus linéaires et les plus reproductibles.

Choix des concentrations

Nous avons réduit de moitié le volume total de liquide mis en oeuvre dans la réaction de MEYER, de manière à augmenter la sensibilité.

Dans ces conditions 20 µg d'amino-6-nitro-4-o-crésol sont facilement détectables et dosables avec une densité optique moyenne de 0,060 à 500 mµ et par rapport à l'essai témoin sans amino-6-nitro-4-o-crésol.

Technique adoptée :

5 ml de solution d'amino-6-nitro-4-o-crésol dans l'eau ammoniacale à 5 % en volumes.

I ml d'acide sulfurique à 20 % en volumes

I pincée de poudre de zinc pesant I00 à 200 mg

Laisser I0 mn en contact en agitant de temps en temps

Filtrer

Prélever 4 ml de filtrat et y ajouter 2 gouttes de solution de bichromate de potassium à I°/oo dans l'eau.

A partir de I0 mn après l'addition du dernier réactif, la mesure de la densité optique peut être faite à 500 mµ.

La coloration reste stable pendant plusieurs heures.

Pour les déterminations de routine nous avons simplifié le mode opératoire : les filtrations sont faites sur des entonnoirs et des filtres identiques et le bichromate de potassium est ajouté à la totalité du filtrat. Les courbes d'étalonnage ainsi obtenues sont linéaires et reproductibles.

2°) - Conclusions.

Nous avons donc retenu le dosage colorimètrique par la réaction de MEYER, pour les déterminations quantitatives d'amino-6-nitro-4-o-crésol. Il permet de doser 20 µg de ce produit en valeur absolue.

TABLEAU N° 3

GAMMES ETALONS POUR LE DOSAGE DE L'AMINO-6-NITRO-4-O-CRESOL PAR LA REACTION DE MEYER

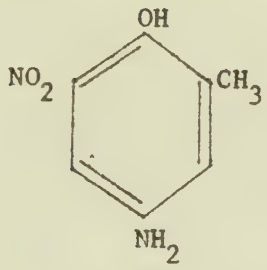
µg d'amino-6-nitro-4-o-crésol.	Densités optiques à 500 mµ par rapport au témoin							
20	0,064	0,059	0,061	0,065	0,059	0,065	0,065	0,061
40	0,125	0,118	0,121	0,124	0,123	0,116	0,130	0,120
60	0,130	0,183	0,186	0,182	0,188	0,185	0,197	0,200
80	0,242	0,238	0,241	0,242	0,244	0,245	0,250	0,251

ARACTERISATION ET DOSAGE DE L'AMINO-4-NITRO-6-O-CRESOL.

T R A V A U X A N T E R I E U R S

I°) - Caractères généraux.

a) - Formule.



b) - Poids moléculaire.

168,14

c) - Préparation.

Nos essais ont été effectués sur un échantillon d'amino-4-nitro-6-o-crésol préparé spécialement pour nous par le laboratoire de Chimie Organique de l'E.N.V. d'Alfort.

2°) - Méthodes de caractérisation et de dosage.

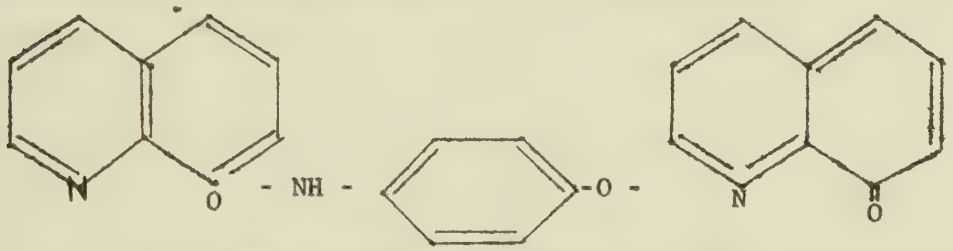
Les travaux que l'on trouve dans la bibliographie concernent surtout le p.amino phénol et l'amino-4-nitro-2-phénol.

a) - Réaction de MEYER.

Les amino-nitro-phénols se comportent comme les dinitrophénols et conduisent à la formation de diamino-phénols qui peuvent ensuite être oxydés en aminoquinone-imines colorées (Voir p. 32).

b) - Réaction avec la 8 hydroxyquinoléine.

CACCIA (I8) indique une méthode de dosage du p. amino-phénol au moyen de la 8 hydroxyquinoléine. La coloration bleue obtenue serait due à la formation d'un composé ayant la formule suivante :



Le p.aminophénol se combine avec les 2 formes tautomères de la 8 hydroxyquinoléine. Cette méthode permet de doser de I à I0 µg de p.amino-phénol.

La technique proposée par CACCIA est la suivante :

I ml de la solution aqueuse de p.amino-phénol

Ajouter I ml d'une solution à I % de 8 hydroxyquinoléine, dans l'acide acétique à I0 % en volumes

Attendre 5 mn et ajouter 2 ml de soude 0,I N

Après 20 mn lire la densité optique au spectrophotomètre à 620 mµ

c) - Réaction de diazo-copulation.

Nous avons déjà indiqué le principe de cette réaction qui peut etre appliquée aussi bien à l'amino-4-nitro-2-phénol qu'à l'amino-2-nitro-4-phénol.

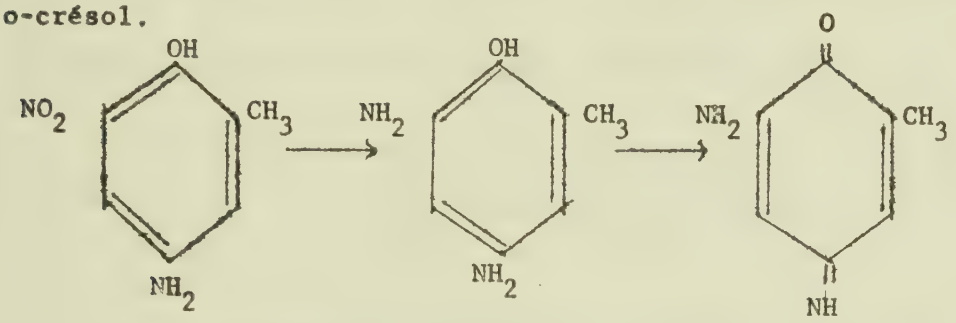
CARACTERISATION ET DOSAGE DE L'AMINO-4-NITRO-6-O-CRESOL.

T R A V A U X P E R S O N N E L S

I°) - Examen critique des méthodes de caractérisation et de dosage.

a) - Réaction de MEYER.

L'amino 4-nitro-6-o-crésol donne une réaction de MEYER positive. Il se comporte de la même façon que l'amino-6-nitro-4-o-crésol. Dans un premier temps, il est réduit par le zinc en milieu sulfrique pour former le diamino-o-crésol.



Le diamino-crésol est ensuite oxydé par le bichromate de potassium en méthyl-2-amino-6-quinone imine.

La technique décrite pour le dosage de l'amino-6-nitro-4-o-crésol a été appliquée à l'amino-4-nitro-6-o-crésol. Les densités optiques par rapport à l'eau distillée sont sensiblement les mêmes dans les deux cas :

TABLEAU N° 4

µg de composé	Densités optiques à 500 mµ	
	Amino-6-nitro-4-o-crésol	Amino-4-nitro-6-o-crésol
0	0,012	0,012
20	0,068	0,072
40	0,132	0,127
60	0,197	0,195
80	0,257	0,253

Nous avons donc considéré cette technique comme valable pour doser l'amino-4-nitro-6-o-crésol, lorsqu'il est séparé de son isomère. Cependant la réaction de diazo-copulation offre l'avantage d'être beaucoup plus sensible. Dans beaucoup de cas nous avons été amenée à utiliser cette dernière de préférence à l'autre. Mais en cas de doute l'une peut servir de contrôle à l'autre.

b) - Essai de caractérisation par la 8 hydroxyquinoléine.

Par analogie nous avons pensé que l'amino-4-nitro-6-o-crésol qui présente le groupement NH_2 en para de l'hydroxyle, pourrait réagir de la même façon que le p. amino-phénol.

Nous avons donc appliqué la technique indiquée par CACCIA (18).

Dans ces conditions et avec I, 2, 4 et 8 µg d'amino-4-nitro-6-o-crésol, la coloration obtenue était identique à celle du témoin.

Un essai avec 20 µg s'étant montré également négatif nous avons abandonné cette technique.

c) - Réaction de Diazo-copulation.

Parmi les agents de copulation possibles, nous avons cherché celui qui donnerait la réaction colorée se prêtant le mieux à un dosage colorimétrique, tout en offrant une bonne sensibilité de détection.

Nous avons donc essayé successivement, le β naphtol, le résorcinol, et la N α naphtyl éthylène diamine.

- Copulation avec le β naphtol.

Nous avons appliqué une technique très voisine de celle qu'indiquait GUERBET (40):

IO ml de solution d'amino-4-nitro-6-o-crésol

2 ml de SO_4H_2 à 20 %, en volumes, dans l'eau distillée

2 ml de nitrite de sodium à 0,I % dans l'eau distillée

Laisser IO mn à l'obscurité

Par ailleurs, mettre dans un tube à essai 2 ml d'une solution de β naphtol à I % dans l'ammoniaque à 20° - 22° Bé

Y verser la solution du diazoïque

Faire passer le colorant ainsi formé dans l'éther

Avec 20,40 et 80 µg d'amino-4-nitro-6-o-crésol nous avons obtenu une coloration orangée peu intense.

- Essai de copulation avec le résorcinol.

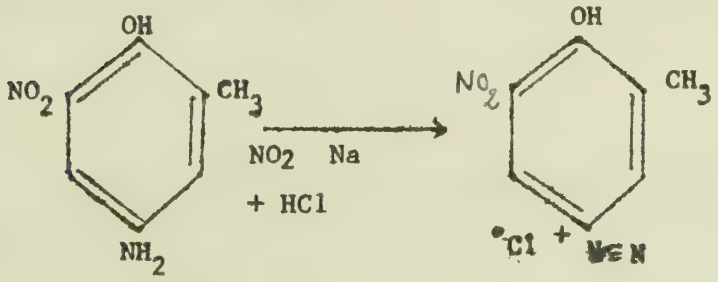
Nous n'avons pas obtenu d'azoïque coloré.

- Copulation avec la N α naphtyl éthylène diamine.

PARKER en I952 (80) avait utilisé ce réactif comme agent copulant sur les sels de diazonium de l'amino-2-nitro-4-phénol et de l'amino-4-nitro-2-phénol. Nous avons pensé qu'un composé voisin comme l'amino-4-nitro-6-o-crésol pourrait réagir d'une façon semblable.

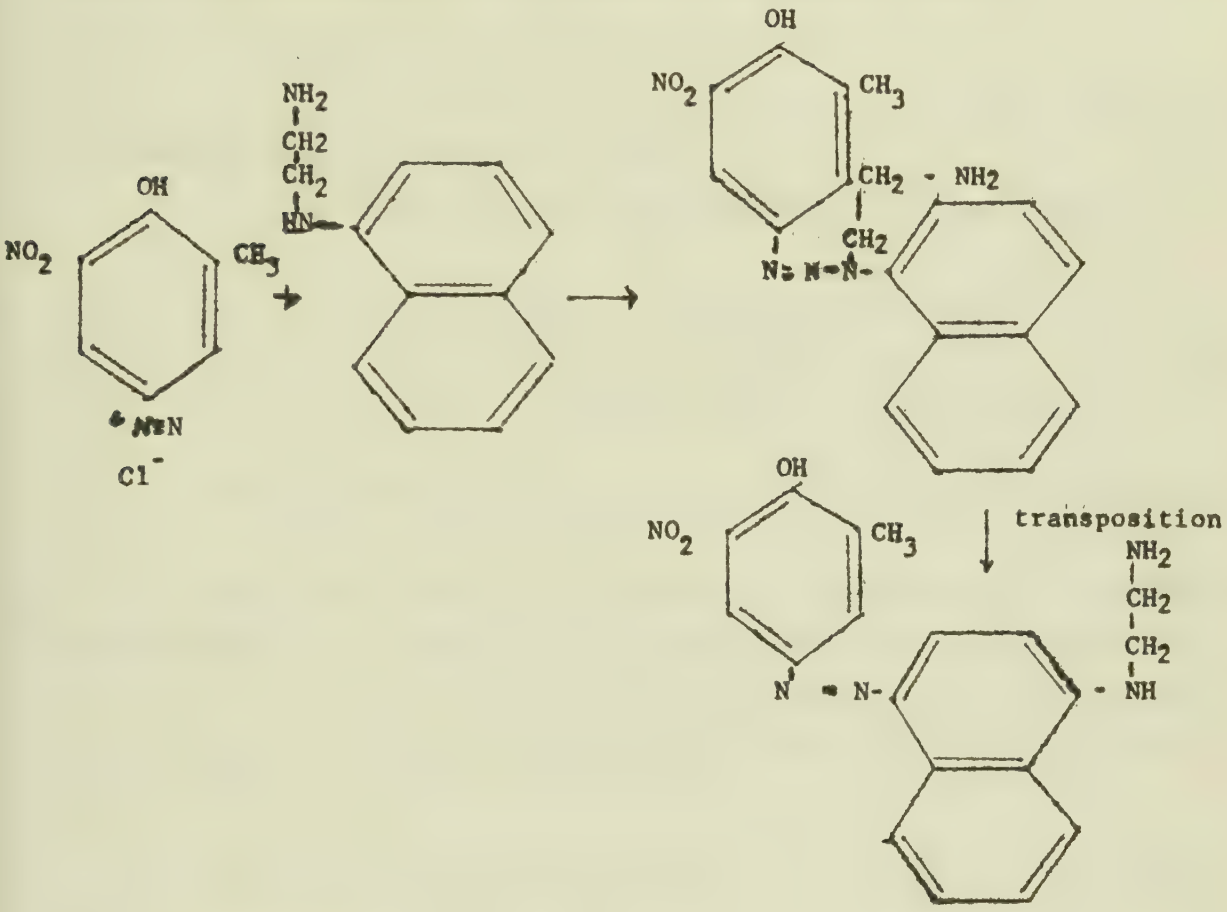
Principe : Nous l'avons déjà exposé p. 45 . Dans le cas de l'amino-4-nitro-6-o-crésol, les différents stades conduisent aux composés suivants :

- Diazotation. - par le nitrite de sodium en milieu chlorhydrique.



On obtient le sel de diazonium de l'amino-4-nitro-6-o-Crésol.

- Copulation. - après destruction de l'excès d'acide nitreux par le sulfamate d'ammonium, la copulation du sel de diazonium avec la N(1 naphtyl éthylène diamine aboutit à la formation d'un azoïque violet.



Technique :

La technique que nous avons adoptée est très voisine de celle qu'avait mise au point PARKER.

- Technique de PARKER (80).

I ml de solution d'amino-4-nitro-6-o-crésol dans l'acide trichloracétique dilué.

2 ml d'eau

I ml d'acide chlorhydrique 5 N

0,5 ml de solution de nitrite de sodium à 0,2 %

Laisser dix minutes à l'obscurité

Ajouter I ml de solution aqueuse de sulfamate d'ammonium à I %

Laisser IO mn à l'obscurité

Ajouter 2 ml d'une solution à 0,5% de N α naphtyl-éthylène-diamine dissoute dans l'acide chlorhydrique 2 N.

Au bout de 30 mn, mesurer la densité optique à 550 mμ

Nous avons étudié différents facteurs, parmi ceux qui peuvent agir sur la bonne reproductibilité des intensités de coloration, afin d'adapter cette réaction le mieux possible à un dosage spectrophotomètrique.

Influence de l'âge de la solution de N α naphtyl-éthylène-diamine.

Nous avons observé que la solution de dichlorhydrate de N α naphtyl-éthylène-diamine se colorait avec le temps, ce qui avait l'inconvénient de conférer aux blancs, des densités optiques supérieures. Nous avons constaté également que la solution du réactif perdait parallèlement de son activité réactionnelle avec le temps.

En préparant le réactif au moment du dosage on évite ces inconvénients.

Influence des temps de latence.

Nous avons recherché quel était le temps de réaction optimum pour l'action du nitrite de sodium et du sulfamate.

Nous avons comparé les intensités de coloration obtenues avec 20 μg d'amino-4-nitro-6-o-crésol, en faisant varier les temps de réaction.

Nous avons obtenu les plus fortes colorations avec IO mn pour le nitrite, et IO mn pour le sulfamate.

Nitrite		Sulfamate
I0 mn	+	I0 mn
20 mn	+	I0 mn
I0 mn	+	20 mn
30 mn	+	I0 mn
I0 mn	+	30 mn
30 mn	+	30 mn

Intensité de coloration décroissante ↓

Evolution de la coloration - Influence du milieu.

-Milieu aqueux.

Nous avons d'abord essayé le milieu aqueux comme dans la technique de PARKER.

L'amino-4-nitro-6-o-crésol était dissous dans l'eau ammoniacale à 5 %. Les quantités de réactifs mises en jeu étaient les suivantes :

2,5 ml solution d'amino-4-nitro-6-o-crésol
I ml d'acide chlorhydrique 5 N
I ml de solution de nitrite de sodium à 0,I % dans l'eau distillée
Laisser I0 mn à l'obscurité
Ajouter I ml de solution de sulfamate d'ammonium à I % dans l'eau distillée
Laisser I0 mn à l'obscurité
Ajouter 2 ml de la solution à 0,5 % de dichlorhydrate de N(α naphtyl éthylène-diamine dans l'eau.

Dans ces conditions nous avons obtenu une nette coloration violette à partir de 2 µg d'amino-4-nitro-6-o-crésol. Mais cette coloration n'était pas assez stable pour permettre une lecture spectrophotomètrique. L'intensité de la coloration augmentait rapidement pendant les I5 premières minutes, puis une décoloration s'amorçait, plus rapide pour les plus fortes concentrations.

- Milieu hydro alcoolique.

Nous avons alors remplacé le milieu aqueux par le milieu hydro alcoolique, l'amino-4-nitro-6-o-crésol étant introduit sous forme de solution éthanolique dans le même volume de 2,5 ml.

Dans ces conditions nous avons également obtenu une nette coloration violette à partir de 2 µg d'amino-4-nitro-6-o-crésol. L'intensité de la coloration augmente rapidement pendant les I5 premières minutes, puis plus lentement pendant les I5 autres minutes. Au-delà de 30 mn l'augmentation devient très lente et se poursuit pendant plus de 24 h, mais c'est alors l'amine copulatrice seule qui est responsable de la coloration, car le tube témoin se colore pareillement. Contrairement à ce qui se passe en milieu aqueux l'azoïque formé reste stable et les densités optiques restent à tout moment proportionnelles aux concentrations, si bien qu'à partir de 30 mn après l'addition du dernier réactif il est possible de faire une lecture spectrophotomètrique valable. Le spectre d'absorption de l'azoïque ainsi formé présente un minimum à 460 mµ et un maximum à 570 mµ.

Technique adoptée.

L'étude de ces différents facteurs nous ont amenée aux conclusions suivantes :

- introduire l'amino-4-nitro-6-o-crésol sous forme de 2,5 ml de solution alcoolique.
- laisser agir le nitrite de sodium IO mn ainsi que le sulfamate d'ammonium.
- utiliser une solution récente de dichlorhydrate de N α naphtyl éthylène-diamine.
- lire la densité optique au spectrophotomètre à 570 mµ
- il est préférable de refaire la gamme étalon pour chaque dosage.

- Gamme étalon.

Préparer une solution à IO µg/ml d'amino-4-nitro-6-o-crésol. Dans une série de tubes à essai introduire, les quantités de solution correspondant à des quantités d'amino-4-nitro-6-o-crésol, comprises entre I et IO µg. Ajouter le volume d'éthanol nécessaire pour avoir 2,5 ml de solution alcoolique.

- Ajouter I ml d'acide chlorhydrique 5 N, puis I ml de solution de nitrite de sodium à 0,I % dans l'eau.

- Laisser IO mn à l'obscurité, puis ajouter I ml de solution de sulfamate d'ammonium à I %.

- Après IO autres minutes à l'obscurité, ajouter 2 ml de solution de N α naphtyl-éthylène-diamine à 0,5 % dans l'eau.

- Lire la densité optique à 570 mµ par rapport à l'eau distillée.

Exemple de gamme obtenue

Amino-4-nitro-6-o-crésol µg	Densités optiques
0	0,0I4
I	0,046
2	0,076
4	0,I44
6	0,223

Dans les premiers temps de l'application de la méthode, nous avons fait la lecture à 550 mµ comme l'indiquait PARKER pour les amino-nitrophénols. A cette longueur d'onde, la coloration suit également la loi de BEER LAMBERT et les densités optiques ne sont qu'un peu plus faibles.

Exemple de gamme obtenue

Amino-4-nitro-6-o-crésol µg	Densités optiques
0	0,008
I	0,036
2	0,065
4	0,I25
6	0,I94

2°) - Conclusions.

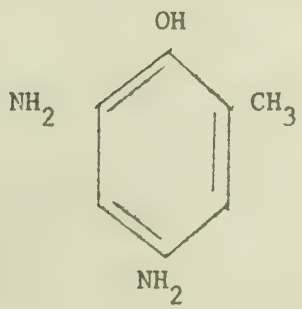
C'est la méthode par diazo-copulation avec la N α naphtyl-éthylène-diamine qui offre la plus grande sensibilité, puisqu'elle permet de doser I µg d'amino-4-nitro-6-o-crésol en valeur absolue. Tant que ce composé ne se trouvera pas en présence de substances susceptibles d'interférer dans la diazo-copulation, c'est cette technique qui sera utilisée de préférence à la réaction de MEYER.

RACTERISATION ET DOSAGE DU DIAMINO-4-6-O-CRESOL.

T R A V A U X A N T E R I E U R S

I°) - Caractères généraux.

a) - Formule.



b) - Poids moléculaire.

I38,I6

2°) - Méthode de caractérisation.

En I9I3, GUERBET, indiquait que le diamino 2-4 phénol donnait la réaction de MEYER sans réduction préalable.(40)

RACTERISATION ET DOSAGE DU DIAMINO-4-6-O-CRESOL.

T R A V A U X P E R S O N N E L S

Théoriquement le diamino-4-6-o-crésol devrait pouvoir être caractérisé, ou dosé, par les mêmes réactions que l'amino-4-nitro-6-o-crésol. Par diazo-copulation puisqu'il possède un groupement amine en para de l'hydroxyle, et par oxydation en amino-quinone-imine puisqu'il possède deux groupements amines.

Nous avons donc essayé d'appliquer au diamino-4-6-o-crésol ces méthodes de dosage (I).

a) - Réaction de diazocopulation.

A partir d'une solution de dichlorhydrate de diamino-4-6-o-crésol à I0 µg/ml dans l'alcool, nous avons fait une gamme étalon selon la technique décrite p.58 . Une gamme a été effectuée parallèlement avec l'amino-4-nitro-6-o-crésol, comme point de comparaison. Au moment de l'addition de l'acide chlorhydrique, nous avons noté l'apparition d'une coloration rose framboise, symptôme de la formation de l'amino-quinone-imine.

(I) - Nos essais ont été effectués sur un échantillon de dichlorhydrate de diamino-4-6-o-crésol préparé spécialement pour nous par les laboratoires de la Sté RHONE-POULENC.

Après l'addition du dichlorhydrate de N α naphtyl-éthylène-diamine la teinte rose a lentement évolué vers le mauve pour donner les densités optiques suivantes à 550 mμ par rapport à l'eau distillée.

TABLEAU N° 5

μg de composé dans la réaction	Densités optiques à 550 mμ	
	Amino-4-nitro-6-o-crésol	Diamino-4-6-o-crésol
0	0,038	0,038
2,5	0,107	0,037
5	0,157	0,045
10	0,277	0,048
20	0,518	0,092

Les densités optiques sont très faibles et ne sont pas proportionnelles aux concentrations. Le diamino-4-6-o-crésol étant rapidement oxydé en aminoquinone-imine, son groupement amine n'est donc plus libre pour être diazoté.

b) - Oxydation en quinone-imine

L'oxydation du diamino-4-6-o-crésol se fait spontanément dès qu'il est en solution. Il n'est pas nécessaire d'ajouter un oxydant comme le bichromate de potassium. Nous avons pu faire une gamme avec une solution alcoolique préparée quelques temps avant la lecture spectrophotomètrique.

TABLEAU N° 6

OXYDATION DU DIAMINO-4-6-O-CRESOL EN QUINONE IMINE

µg de dichlorhydrate de diamino-crésol par ml de solution	Densités optiques à 500 mµ par rapport à l'alcool
5	0,097
IO	0,20I
I5	0,287
20	0,385

La réaction de MEYER sans réduction préalable pourrait donc être appliquée au dosage du diamino-o-crésol.

ONCLUSIONS.

Parmi les différentes réactions colorées que nous venons d'étudier, nous en retiendrons donc trois qui seront appliquées à des déterminations quantitatives spectrophotomètriques.

La réaction de PARKER à la méthyl-éthyl-cétone en milieu alcalin sera utilisée pour le dosage du DNOC. Il sera ainsi possible de doser 5 µg en valeur absolue.

La réaction de diazo-copulation avec l'α naphtyl-éthylène-diamine très sensible, permettra de détecter jusqu'à I µg d'amino-4-nitro-6-o-crésol.

La réaction de MEYER avec formation de quinone-imine pourra être appliquée aussi bien au dosage du DNOC qu'à celui des amino-nitro-o-crésols, mais avec une sensibilité peu élevée (20 µg). Nous l'utiliserons essentiellement pour les déterminations de l'amino-6-nitro-4-o-crésol pour lequel nous n'avons pas trouvé de méthode plus sensible. Elle permettra également dans certains cas de contrôler les résultats de la réaction de diazo-copulation effectuée sur l'amino-4-nitro-6-o-crésol.

ISOLEMENT ET DOSAGE DU DNOC ET DE SES METABOLITES A PARTIR DES MILIEUX BIOLOGIQUES

Les méthodes de dosage du DNOC et de ses métabolites ayant été mises au point, nous avons recherché les techniques d'extraction qui permettraient d'isoler chacun de ces composés à partir des tissus organiques, avec le meilleur rendement.

Pour effectuer ce travail, il nous a paru nécessaire de procéder tout d'abord à l'étude des propriétés physico-chimiques de ces composés, en fonction desquelles les processus d'extraction doivent être choisis.

Puis, avant d'aborder le problème de l'extraction proprement dite à partir des milieux biologiques, nous avons mis au point les techniques de séparation des composés étudiés à partir d'une solution aqueuse.

Enfin, dans une troisième étape nous avons appliqué ces techniques à l'isolement des composés à partir des milieux biologiques suivants : urine - sang - organes - tissus végétaux.

TUDE DES CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DU DNOC ET DE SES METABOLITES

NTERVENANT DANS LE MODE D'EXTRACTION

I°) Volatilité

a) DNOC

Le caractère phénolique du DNOC lui confère une certaine volatilité.

Sa tension de vapeur est de 105 x 10^{-6} mm de mercure à 25°c (Martin) (71). Il sera donc facilement entraînable par la vapeur d'eau en milieu acide, son hydroxyle restant libre. Avec surchauffe à 117° nous avons constaté que l'entrainement de 500 µg de DNOC était total dans 50 ml de distillat. Sans surchauffe l'opération est beaucoup plus longue (1 litre de distillat pour 1 mg de DNOC.)

b) Les amino-nitro-crésols et le diamino-crésol

Ces composés sont des substances fixes. En milieu alcalin, ils sont sous forme d'amino-nitro-crésolates alcalins ou de diamino-crésolates et en milieu acide, sous forme de sels d'amines. Ils ne seront donc pas entrainables par la vapeur d'eau.

2°) Instabilité

Le dinitro 4 - 6 - O - crésol et l'amino-6-nitro 4 - O - crésol sont des composés relativement stables en solution.

Par contre l'amino-4-nitro 6 - O crésol et le diamino 4 - 6 - O-crésol qui présentent tous deux un groupement amine en para de l'hydroxyle sont très facilement oxydables.

a) Instabilité de l'amino 4 nitro 6 - O crésol

Nous avons observé les faits suivants

- Conservé en milieu aqueux alcalin, l'amino 4 - nitro 6 - O - crésol s'altère rapidement et ne donne plus avec la même intensité la réaction de diazo-copulation ou la réaction de MEYER.

- En solution alcoolique la conservation est meilleure, mais ne doit pas excéder une semaine.

- L'amino 4 - nitro 6 - O - crésol est très sensible à l'action des agents oxydants. En solution dans l'éther non débarrassé de peroxyde, il est immédiatement altéré et ne donne plus la réaction de diazo-copulation avec la naphtyl-ethylène-diamine.

Notons qu'il s'agit là d'un problème très général concernant les ethers-oxydes qui ont la propriété de se peroxyder facilement à la lumière et en présence d'oxygène. Deux inconvénients résultent de cette propriété. D'une part les péroxydes peuvent provoquer des explosions en fin de distillation des éthers-oxydes. D'autre part leurs propriétés oxydantes risquent d'altérer certains composés fragiles mis en solution dans ces solvants.

Plusieurs procédés ont été indiqués pour détruire les peroxydes dans l'éther. PESEZ et POIRIER (87) signalent que le procédé le plus usuel consiste à agiter l'éther avec une solution acide d'un sel ferreux. On transforme ainsi le peroxyde en acétaldéhyde et en acide acétique. On élimine l'acétaldéhyde par un lavage avec une solution d'acide chromique, puis l'acide acétique par un lavage à la soude diluée. L'éther est ensuite distillé.

La technique de HARMSE(43 - 44) que nous avons utilisée est la suivante :

A 250 ml d'éther ajouter I g de bisulfite de sodium dans I5 ml d'eau. Rejeter la phase aqueuse. Ajouter 4 g de permanganate de potassium dissous dans 50 ml de soude 2 N. Rejeter la phase aqueuse et distiller l'éther.

b) Instabilité du diamino 4 - 6 - O crésol

En solution aqueuse, le dichlorhydrate de diamino 4 - 6 - O crésol s'oxyde assez rapidement en méthyl 2 - amino 6 - quinone - imine rouge framboise.

En solution aqueuse alcalinisée par l'ammoniaque, l'altération est encore plus rapide et aboutit à la formation de composés colorés en brun violacé foncé.

En solution aqueuse acidifiée par H C l à un titre d'environ 2 N ,la conservation est meilleure.

Ces altérations ont été mises en évidence par chromatographie sur papier avec un système butanol/acide acétique/eau (4-I-5) employé par Smith (IOI)pour caractériser le DNOC et les dérivés monoaminés. Ces composés étant fortement colorés en milieu alcalin, la révélation consistait en une simple pulvérisation de soude diluée.

Lorsque le dichlorhydrate de diamino-crésol utilisé était en solution aqueuse, nous avons obtenu 2 taches :

- I tache violette de Rf O
- I tache brune de Rf 0,22

S'il était en solution chlorhydrique 2 N, seule la tache brune était obtenue.

3°) Solubilités

a) DNOC

Solubilités dans l'eau.

- Eau distillée : le DNOC est très peu soluble (0,015g dans 100 ml d'après nos déterminations)

- Eau acidifiée par l'acide trichloracétique : le DNOC est légèrement plus soluble (0,052 g dans 100 ml d'après nos déterminations)

- Eau alcaline : le DNOC passe à l'état de dinitro-crésolate alcalin soluble.

Solubilités dans les solvants organiques. Extraction à partir des solutions aqueuses.

Le DNOC est soluble dans la plupart des solvants organiques, alcool, acétone, éther éthylique, éther de pétrole.

Lors des essais d'extraction du DNOC à partir d'une solution aqueuse avec les solvants organiques, nous avons retenu l'éther de pétrole. En acidifiant la solution jusqu'à un pH égal à I, 98,5 % du DNOC sont extraits par 6 extractions successives par l'éther de pétrole, dans la proportion de I partie d'éther de pétrole pour 4 parties de solution aqueuse.

Dans les mêmes conditions les amino-nitro-O-crésols ne sont pas extraits par l'éther de pétrole.

b) Amino 6 - Nitro 4 - O - Crésol

- Solubilités dans l'eau

- Eau distillée ; l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol est très peu soluble.

- Eau acidifiée par un acide fort ; l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol passe à l'état de sel d'amine soluble.

- Eau alcaline : l'amino 4 - nitro 6 - O - crésol donne un amino 6 - nitro 4 - O - crésolate alcalin soluble.

- Solubilités dans les solvants organiques. Extraction à partir des solutions aqueuses.

L'amine 6 - nitro 4 - O - crésol est soluble dans la plupart des solvants organiques.

Son extraction à partir des solutions aqueuses ne peut se faire qu'à un pH compris entre 4 et 6. En dehors de ces limites il passe à l'état de sel d'amine ou de crésolate alcalin.

Nous avons comparé les pourcentages d'extraction obtenus avec différents solvants à pH 4 à 5, en effectuant trois épuisements successifs avec I partie de solvant pour 2 parties de solution aqueuse.

Dans ces conditions l'éther éthylique sans peroxyde extrait la totalité de l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol, tandis que le benzène et le chloroforme ne permettent qu'une extraction partielle.

c) Amino 4 - Nitro 6 - O - Crésol

Solubilités dans l'eau

L'amino 4 - nitro 6 - O - crésol se comporte comme son isomère, dans l'eau distillée, dans l'eau fortement acidifiée et dans l'eau alcaline.

Solubilités dans les solvants organiques. Extraction à partir des solutions aqueuses.

L'amino 4-nitro 6- O - crésol, comme son isomère, est soluble dans la plupart des solvants organiques

ApH 4-5, il peut être totalement extrait d'une solution aqueuse par 3 épuisements successifs aussi bien avec le benzène ou le chloroforme, qu'avec l'éther éthylique (sans peroxyde) en prenant I partie de solvant pour 2 parties de solution aqueuse.

d` Diamino 4 - 6 - O - Crésol

Solubilités dans l'eau

Le diamino 4 - 6 - O - crésol a été synthètisé sous forme de dichlorhydrate. Ce sel est très soluble dans l'eau, mais y est vite transformé. En milieu acide il prend la forme quinonique rouge framboise, en milieu ammoniacal, il donne un composé jaune assez rapidement dégradé.

Extraction par les solvants organiques à partir des solutions aqueuses.

Du fait de sa grande instabilité le dichlorhydrate de diamino 4 - 6 - O - crésol est très difficile à extraire.

Dissous dans l'eau distillé, il ne peut pas être extrait par un solvant organique.

En élevant le pH de la solution de manière à faire passer le sel d'amine à l'état d'amine libre, on obtient un composé jaune instable, partiellement extrait par l'éther éthylique.

Etant donné l'instabilité de ce composé, et la difficulté de l'extraire et de le doser à partir de simples solutions, nous avons considéré comme impossible son extraction et son dosage à partir des tissus organiques. Il est d'ailleurs vraisemblable que s'il se forme au cours du métabolisme in vivo du DNOC, son existence n'est que transitoire et fugace. SMITH (101) n'a pas trouvé le diamino 4 - 6 - O - crésol dans l'urine de lapins traités par le DNOC. GUERBET n'a pas identifié le diaminophénol dans son étude sur les intoxications par le dinitrophénol(42) PARKER a supposé la formation de ce même produit, mais n'a pas pu l'identifier lors de son étude sur la transformation in vitro du DNP dans les homogénats de foie de rat.(80)

e) Conclusions

Les études de solubilités du DNOC et des deux amino - nitro - O - crésols montrent qu'il sera possible de séparer le DNOC en l'extrayant par l'éther de pétrole en milieu fortement acide. Cette méthode est préférable à celle de l'entraînement par la vapeur d'eau, car elle est beaucoup plus rapide.

Les deux amino- nitro - O - crésols restant dans la phase aqueuse pourront tous deux être extraits par l'éther éthylique en milieu légèrement acide (pH 4 à 5). Mais il ne sera pas possible de les séparer complètement l'un de l'autre par extraction par un solvant organique, car leurs solubilités sont trop voisines.

Nous avons donc cherché un autre moyen de séparation. La chromatographie sur colonne nous a donné des résultats satisfaisants.

4°) Adsorption

L'alumine a un pouvoir adsorbant vis à vis d'un grand nombre de substances. Ces substances sont d'autant plus adsorbables qu'elles sont plus polaires. PARKER en 1952 (80) avait utilisé la chromatographie sur colonne d'alumine pour séparer le dinitro 2 - 4 phénol, l'amino 2 - nitro 4 - phénol et l'amino-4-nitro-2-phénol. On pouvait penser que le DNOC et ses deux métabolites nitro-aminés se comporteraient de façon assez voisine. En effet l'hydroxyle d'une part, et le groupement amine d'autre part, favorisent l'adsorption des composés qui les possédent. Il était donc possible que l'élution se fasse différemment avec le DNOC et avec ses deux dérivés mono aminés. C'est ce que nous avons entrepris d'étudier.

a) Préparation de la colonne

Nous avons utilisé de petites colonnes à chromatographie de I6 mm de diamètre et de 250 mm de hauteur.

Dix gramme d'alumine standard sont introduits sous forme de bouillie dans l'alcool éthylique. La colonne d'alumine est lavée deux fois par son volume d'alcool.

Le DNOC et les amino nitro - O - crésol sont déposés goutte à goutte et avec précaution au sommet de la colonne sous forme de solution alcoolique.

b) Elution

L'alcool à 95° élue le DNOC et l'amino 4 - nitro 6 - O - crésol à des vitesses sensiblement égales. Ces deux composés apparaissent sous forme d'une bande jaune pour le DNOC et d'une bande pourpre violacé pour l'amino 4 - nitro 6 - O - crésol. Ces bandes atteignent le bas de la colonne après un volume d'éluat qui peut naturellement varier si l'on utilise des lots d'alumine différents. Nous avons été amenée nous-même à employer deux alumines standard de fabrication différente. Pour l'une le volume d'éluat recueilli avant la bande de DNOC et d'amino 4 - nitro 6 - O - crésol, était de IO à I5 ml et pour l'autre de 20 à 25ml.

L'amino 6 - nitro 4 - O - crésol n'est pratiquement pas désorbé par l'alcool éthylique à 95°. Quand le DNOC et l'amino 4 - nitro 6 - O - crésol ont été complétement élués, l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol est encore en haut de la colonne d'alumine sous forme d'une bande orangée.

Il est vraisemblable que la proximité du groupement NH2 et de l'hydroxyle confère à l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol une plus forte polarité qui expliquerait sa plus forte adsorption sur l'alumine. Pour le désorber il faut donc augmenter la polarité de l'éluant. Ce résultat est obtenu en ajoutant un peu d'ammoniaque à l'alcool éthylique. En utilisant une solution à IO % d'ammoniaque à 22° Bé dans l'alcool à 95°, la bande de l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol atteint le bas de la colonne après IO ml d'éluat.

c) Pourcentage de récupération

Pour chacun des 3 composés nous avons déterminé le pourcentage de récupération après passage sur IO g d'alumine. Chaque produit a été déposé au sommet d'une colonne, élué jusqu'à disparition de l'anneau coloré sur la colonne, et dosé dans l'éluat.

Les résultats figurent dans le tableau annexe. Le pourcentage de récupération est de 86 % pour l'amino 4 - nitro 6 - O - crésol, e 95 % pour l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol et de IOO % pour le DNOC.

d) Conclusions

Le DNOC ayant la même vitesse d'élution que l'amino 4 - nitro 6 - O - crésol, il devra être séparé de ses dérivés aminés avant le passage sur colonne d'alumine.

La séparation des deux isomères mono-aminés se fera par chromatographie sur colonne d'alumine en utilisant deux éluants différents : l'alcool éthylique à 95° pour l'amino 4 - nitro 6 - O - crésol et une solution alcoolique d'ammoniaque à IO % pour l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol.

TABLEAU N°7

POURCENTAGES DE RECUPERATION DU DNOC ET DES AMINO-NITRO-CRESOLS

APRES PASSAGE SUR COLONNE D'ALUMINE

...nces	DNOC		AMINO 4-NITRO 6-O-CRESOL		AMINO 6-NITRO 4-O-CRESOL	
	Quantité introduite en µg	% de récupération	Quantité introduite en µg	% de récupération	Quantité introduite en µg	% de récupération
					I 000	95
	500	I00	500	84	500	94
			200	85		
			I00	84		
					I00	I00
			I00	98		
					83	87
			83	96		
			83	72		
			60	8I		
			4I	99	4I	I00
			25	77		
		I00		86,2		95

EXTRACTION SEPARATION ET DOSAGE DU DNOC ET DES DEUX AMINO-NITRO-O-CRESOL A PARTIR D'UNE SOLUTION AQUEUSE

T R A V A U X A N T E R I E U R S

En 1918 GUEBERT (40), dans son étude sur la recherche toxicologique du dinitrophénol, indiqua une technique de séparation de ce composé et de ses métabolites à partir d'une solution aqueuse, ce qui devait lui servir de base pour l'isolement et le dosage de ces composés à partir des milieux biologiques. Elle comportait les étapes suivantes :

1°) Isolement du D.N.P

Réalisé par une extraction par l'éther de pétrole en milieu sulfurique. La phase organique était alors agitée avec de l'eau ammoniacale dans laquelle passait le D.N.P. sous forme de dinitrophénolate soluble. Sur cette solution aqueuse, le D.N.P était caractérisé par la réaction de Meyer.

2°) Isolement de l'amino 2-nitro 4-phénol

De la phase aqueuse acide résiduelle, l'amino 2-nitro 4-phénol était extrait par l'éther éthylique. Puis après passage en solution dans l'eau ammoniacale, il était caractérisé par la réaction de diazo-copulation avec le β naphtol.

3°) Isolement de l'amino 4- nitro 2 - phénol

La phase aqueuse résiduelle était alcalinisée par l'ammoniaque, puis acidifiée par l'acide acétique. L'amino 4 - nitro 2 - phénol pouvait alors être extrait par l'éther, puis caractérisé par la réaction de diazo-copulation après passage en solution dans l'eau ammoniacale.

EXTRACTION SEPARATION ET DOSAGE DU DNOC ET DES DEUX AMINO- NITRO-O-CRESOLS A PARTIR D'UNE SOLUTION AQUEUSE

T R A V A U X P E R S O N N E L S

L'application de la méthode de Guerbet au cas du DNOC et de ses métabolites, ne nous a pas donné de résultats satisfaisants, car elle ne permettait pas d'obtenir une bonne séparation des deux isomères mono-aminés. Nous avons donc dû mettre au point une technique différente, faisant appel à la chromatographie sur colonne, pour obtenir la séparation des amino-nitro-crésols, et susceptible d'être appliquée à un extrait de tissu organique ou végétal.

Nous en étudierons successivement les différentes étapes.

I°) Hydrolyse acide

Afin de libérer le DNOC et ses deux dérivés aminés de leurs éventuelles combinaisons, l'extrait aqueux est rendu 2 N au moyen de l'acide chlorhydrique, et soumis à une ébullition sous reflux pendant deux heures.

2°) Extraction - Séparation et dosage du DNOC

Après refroidissement, l'hydrolysat est soumis à 6 extractions par l'éther de pétrole. Les phases organiques rassemblées sont lavées par trois fois avec quelques ml d'eau distillée. ces eaux de lavage sont ajoutées à la phase aqueuse. La phase organique est séchée par filtration sur coton hydrophile. Le sulfate de soude anhydre ne peut pas être employé car il retient un peu du DNOC avec les gouttelettes d'eau.

L'éther de pétrole est évaporé par un courant d'air, et le résidu est repris par un volume déterminé d'alcool éthylique (5 ou 10ml).

Cet extrait peut être dans certains cas avantageusement purifié par passage sur une colonne de 10 g d'alumine avec élution par l'alcool éthylique. L'éluat est recueilli à partir du moment où l'anneau jaune de DNOC atteint le bas de la colonne. Pour les quantités $\leqslant$ à 1000 µg, tout le DNOC est recueilli dans 50 ml d'éluat.

L'éluat est évaporé sous vide et repris par 10,25, ou 50 ml d'eau alcalinisée par le mélange CO_3Na_2 + Cl Na préconisé par PARKER (78) suivant la quantité de DNOC probable.

Le dosage est effectué sur 5 ml selon la méthode de PARKER (78). Si la concentration est trop forte, le dosage est recommencé après dilution. Dans certains cas où les impuretés n'interfèrent pas, le résidu d'évaporation de l'éther de pétrole peut être directement repris par l'eau alcaline, et l'on effectue le dosage sur 5 ml de cette solution.

3°) Extraction - Séparation et dosage de l'amino 4 - Nitro 6 - O - crésol et de l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol

a) Extraction

La phase aqueuse résiduelle est neutralisée par l'ammoniaque à 22° Bé, puis aussitôt acidifiée jusqu'à un pH de 4 à 5 par quelques gouttes d'acide acétique.

Les deux amino-nitro - O - crésols sont alors extraits par l'éther éthylique privé de peroxydes. Trois extractions par un volume d'éther égal à la moitié du volume de la phase aqueuse, font passer la totalité des deux composés dans la phase organique. Celle-ci est lavée trois fois avec quelques ml d'eau distillée. L'éther est évaporé sous vide à 40° et le résidu est aussitôt repris par un volume déterminé d'alcool à 95° (5 ou 10 ml)

b) Séparation

Une quantité aliquote de cet extrait est déposée goutte à goutte au sommet d'une colonne d'alumine préparée comme nous l'avons

indiqué précédemment. L'élution par l'alcool fait migrer rapidement la bande pourpre violacé de l'amino 4 nitro 6 - O - crésol. Les dix ou vingt premiers ml sont rejetés (ce volume est à déterminer pour chaque nouveau lot d'alumine), puis l'éluat est recueilli dans une éprouvette graduée jusqu'à disparition de la coloration pourpre sur la colonne. Pour les quantités $\leqslant$ 500 µg, tout l'amino 4 - nitro 6 - O - crésol est recueilli dans 25 ml d'éluat ajustés dans un ballon jaugé.

L'élution de l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol est réalisée avec l'alcool contenant IO % d'ammoniaque à 22° Bé. La coloration de la bande orangée s'intensifie sous l'effet de l'ammoniaque, de telle sorte que IO µg du composé sont ainsi nettement perceptibles.

L'anneau orangé atteint le bas de la colonne après IO ml d'éluat incolores qui sont rejetés. L'amino 6 - nitro 4 - O - crésol est alors recueilli jusqu'à disparition de l'anneau orangé sur la colonne. Pour les quantités $\leqslant$ 500 µg, tout l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol est recueilli dans 25 ml d'éluat ajustés dans un ballon jaugé.

c) Dosage de l'amino 4 - nitro 6 - O - crésol

- Par la réaction de diazo-copulation

2,5 ml de l'éluat alcoolique sont prélevés et le dosage colorimètrique est effectué selon la technique décrite p 58

Si nécessaire, le dosage est recommencé après concentration ou dilution de l'éluat.

Même quand il n'est pas apparu d'anneau pourpre violacé lors du passage sur colonne d'alumine, le même volume d'éluat est recueilli, et la réaction de diazo-copulation est effectuée, pour le cas où l'extrait analysé contiendrait des quantités d'amino 4 - nitro 6 - O - crésol inférieures à 20 µg.

Par la réaction de Meyer

Une quantité aliquote de l'éluat est évaporée sous vide à 40 - 50°c et reprise par 5 ou IO ml d'eau ammoniacale à 5 % pour dissoudre le résidu d'amino 4 - nitro 6 - O - crésol. Le dosage colorimètrique est effectué sur 5 ml de cette solution selon la technique décrite p.47

d) Dosage de l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol

Une quantité aliquote de l'éluat ammoniaco - alcoolique est évaporée sous vide à 40 - 50°c et reprise par 5 ou IO ml d'eau ammoniacale. Le dosage colorimètrique est effectué sur 5 ml de cette solution selon la technique décrite p.47

4°) Valeur de cette méthode

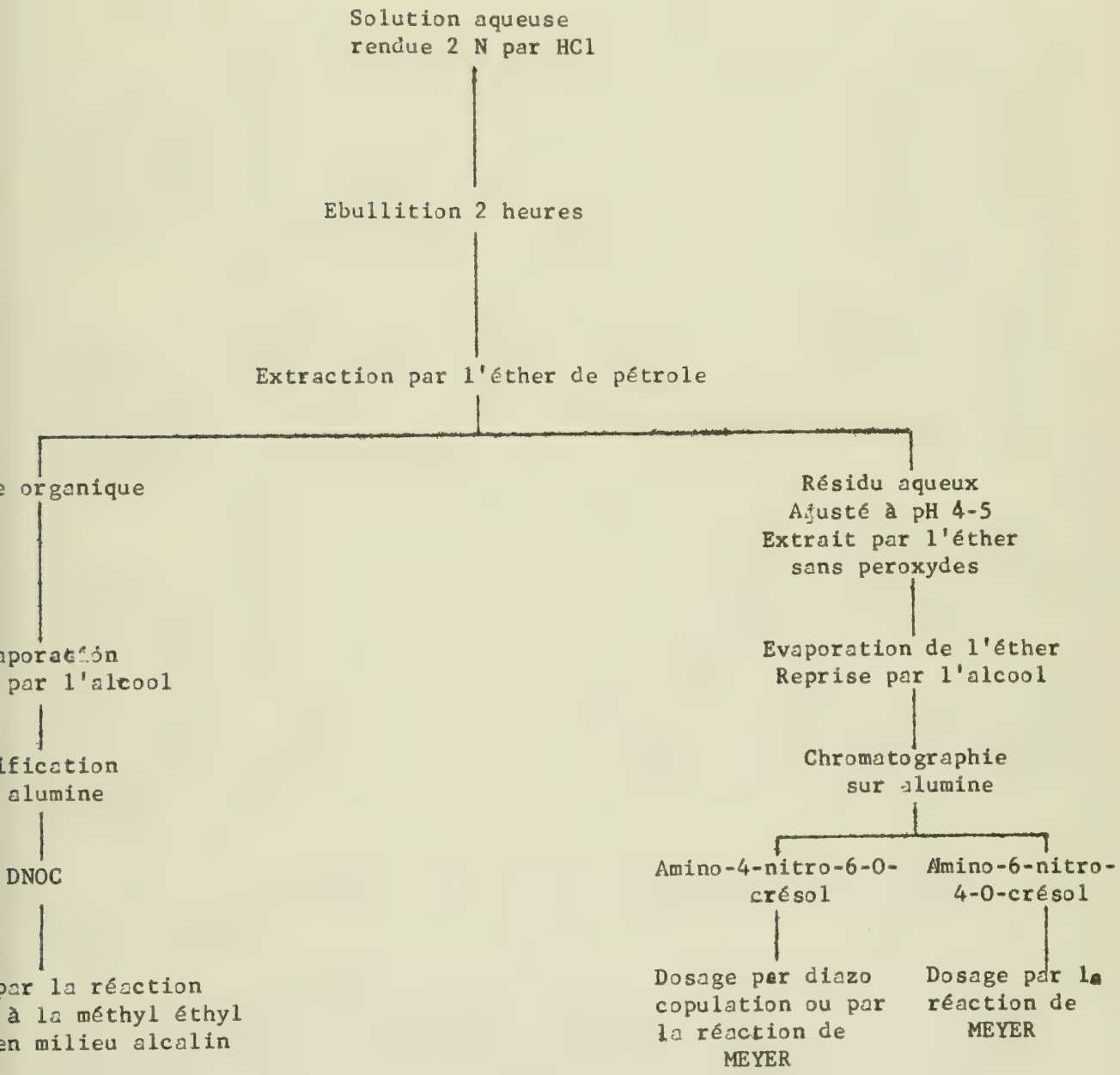
Avant d'appliquer cette méthode aux extraits de tissus animaux ou végétaux, nous avons déterminé le pourcentage de récupération des trois composés étudiés, à partir d'une solution aqueuse. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

TABLEAU N° 8

D N O C		Amino-4- nitro-6- O - crésol		Amino-6- nitro-4- O - crésol	
µg introduits	% récupération	µg introduits	% récupération	µg introduits	% récupération
I 000	96	I 000	68	I 000	9I
500	97	500	80	500	84
500	92	500	75	500	9I
	95 %		74 %		88 %

En prenant en considération la relative fragilité des amino-nitro-O-crésols et en particulier celle du dérivé aminé en para, nous avons estimé la méthode satisfaisante.

SCHEMA DE L'EXTRACTION DU DNOC ET DES AMINO-NITRO-O-CRESOLS



EXTRACTION SEPARATION ET DOSAGE DU DNOC ET DE SES DEUX AMINO-NITRO-O-CRESOLS A PARTIR DE L'URINE

T R A V A U X - A N T E R I E U R S

Guerbet en 1918 (40) avait indiqué une technique d'extraction du D.N.P. et de ses métabolites à partir de l'urine. Après hydrolyse en milieu sulfurique des composés conjugués, l'urine était neutralisée par l'ammoniaque, puis acidifiée par l'acide acétique. L'extraction était alors conduite comme dans le cas des solutions aqueuses (voir p 76).

En 1935, MEYER et DRUTEL (74) signalèrent que l'acide indolacétique présent dans l'urine pouvait interférer dans la réaction de Meyer utilisée pour caractériser le D.N.P. Aussi proposèrent-ils d'effectuer une défécation de l'urine par le réactif de PATEIN avant de pratiquer l'extraction par l'éther.

En 1949, PARKER (78) fut l'un des premiers à faire des recherches sur le dosage du DNOC dans les milieux biologiques. Il mit au point une technique qui permettait de faire simultanément l'extraction et le dosage du DNOC dans l'urine : 5 ml d'urine étaient agités avec un volume égal de méthyl - éthyl - cétone en présence d'un mélange de sels alcalins. La densité optique de la phase cétonique était lue au spectrophotomètre à 430 mμ -

Par la suite, cette technique fut très utilisée par de nombreux auteurs.

En 1956 BREINLICH (13) lors d'une analyse consécutive à une intoxication mortelle par le DNOC., eut recours à deux procédés d'extraction, d'une part la défécation par l'acétate de plomb en présence de phosphate de sodium suivie d'une extraction par l'éther, et d'autre part l'entraînement à la vapeur d'eau qui permettait d'isoler de DNOC.

EXTRACTION SEPARATION ET DOSAGE DU DNOC ET DES DEUX AMINO-NITRO-O-CRESOLS A PARTIR DE L'URINE DE LAPIN

T R A V A U X P E R S O N N E L S

La méthode que nous avions mise au point pour l'extraction et la séparation de ces trois composés à partir d'une solution aqueuse a été appliquée à l'urine. Dans un premier temps nous avons étudié la valeur des blancs que pouvait donner l'urine témoin, puis nous avons déterminé les pourcentages de récupération des trois corps à partir d'une urine où ils avaient été préalablement introduits.

I°) Etude de l'urine témoin

a) Extrait correspondant au DNOC

Le passage sur colonne d'alumine permet de séparer le DNOC de pigments jaune orangé qui se trouvent en quantité plus ou moins importante dans les urines témoins, et qui pourraient interférer dans le dosage du DNOC par le méthyl éthyl cétone.

Cette séparation permet d'avoir des blancs d'urine nuls. C'est ce que nous avons observé dans cinq déterminations à partir d'échantillons allant de 20 à 100 ml d'urine.

b) Extraits correspondant aux dérivés aminés

Le passage sur colonne d'alumine retient une grande partie des impuretés extraites par les solvants organiques, mais il reste cependant encore quelques substances susceptibles d interférer.

Substances interférentes pour l'amino 4- nitro 6- O - crésol

Dans le dosage par diazo-copulation l'extrait d'urine témoin

donne une réaction parasite avec formation d'un azoïque de couleur mauve rosé dont la maximum d'absorption se situe à 560 mμ. Ceci peut entraîner une erreur par excés qui peut aller jusqu'à I μg par ml d'urine et qui varie d'un échantillon à l'autre.

Dans le dosage par formation de méthyl-aminoquinonimine les impuretés de l'urine interfèrent par leur coloration jaunâtre qui entraîne une augmentation de la densité optique à 500 mμ variable également d'un échantillon à l'autre.

Substances interférentes pour l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol

Comme pour l'amino 4 - nitro 6 - O - crésol une coloration jaunâtre peut modifier la densité optique dans la réaction de Meyer.

Essais de défécation et de purification

- La défécation de l'urine par l'acétate de plomb a été sans effet sur les substances interférentes.

- La défécation par le réactif nitro-mercurique de PATEIN et DUFAU n'est pas utilisable car elle entraîne la précipitation des amino-nitro-crésols.

- La purification des extraits par le charbon n'a pu être employée, les composés à doser étant adsorbés eux-mêmes.

Elimination spectrophotomètrique des interférences

Nous avons utilisé le fait que les substances qui interfèrent dans le dosage par la réaction de Meyer, le font par leur coloration jaune en milieu acide fort, tandis que les amino-nitro-crésols sont incolores dans ces conditions. La coloration jaune des impuretés peut être atténuée par l'action réductrice du zinc en milieu acide, mais elle réapparaît sous l'action oxydante du bichromate de potassium.

En faisant deux lectures spectrophotomètriques on peut éliminer la densité optique due à ces impuretés. Nous avons procédé de la façon suivante :

- IO ml de la solution ammoniacale du dérivé nitro aminé sont additionnés de 2 ml d'acide sulfurique à 20 % en volume. Il est souvent nécessaire de filtrer sur filtre très lent pour éliminer les opalescences Une première lecture est alors effectuée sur cette solution jaunâtre et donne une première densité optique D, par rapport à l'eau distillée.

Puis 6 ml sont prélevés et additionnés de IOO à 200 mg de poudre de zinc et le dosage est effectué normalement selon la technique précédemment indiquée p. 47 On obtient une deuxième densité optique DI par rapport à l'eau distillée. Par ailleurs le blanc de la gamme donne une densité optique DO. Dans les urines contenant les amino - nitro - O - crésols, la différence D2 - (Do + II) donne la densité optique D correspondant au composé aminé présent.

2°) Pourcentages de récupération

Le tableau n°9 donne, les pourcentages de récupération obtenus au cours de 9 déterminations sur des urines auxquelles des quantités déterminées des trois composés étudiés avaient été ajoutés.

Ils peuvent être considérés comme satisfaisants pour le DNOC et la technique utilisée pourra permettre des dosages quantitatifs puisque la moyenne de récupération est de 82 %.

Pour les dérivés aminés, composés beaucoup plus fragiles les déterminations ne pourront être que semi-quantitatives, mais fourniront quand-même des valeurs comparatives lors des expérimentations sur animaux.

POURCENTAGES DE RECUPERATION DES TROIS COMPOSES A PARTIR DE L'URINE

Essais	Volume d'urine ml	DNOC		Amino-4-nitro-6-o-crésol			Amino-6-nitro-4-o-crésol		
		µg introduits	% Récupération	µg Introduits	% récupération		µg Introduits	% récupération	
					I lecture	2 lectures		I lecture	2 lectures
I	20	90	77						
2	20	80	62,5	80	78	40	80	67,5	48
3	IO	200	87						
4	I5	200	72	200	74,5	55	200	93	
5	I5	200	72,5	200	84	67	200	84	65
6	II8	800	84	200	4I	22	600	37	25
7	II0	200	99	500	67	47	500	5I	45
8	I00	200	93,5				500	30	22
9	40	500	84	500	33	26	500	I00	97
Moyennes			82 %		63 %	43 %		66 %	50 %

EXTRACTION, SEPARATION ET DOSAGE DU DNOC ET DES DEUX AMINO - NITRO - O - CRESOLS A PARTIR DU SANG.

T R A V A U X A N T E R I E U R S

Toute extraction à partir du sang doit comporter tout d'abord une précipitation des protéines. Dans les travaux effectués sur les dérivés nitrés ou aminés des phénols, on relève plusieurs techniques de défécation.

I° Précipitation par les acides forts.

a) Par l'acide trichloracétique

GUERBET (40) utilisa l'acide trichloracétique à 20 %. Le précipité ayant été séparé par filtration, le filtrat était soumis à diverses extractions par l'éther, pour isoler le dinitrophénol et ses métabolites.

b) Par l'acide chlorhydrique

Cette technique a été utilisée par LESTER et GREENBERG (65) pour la recherche des p. amino phénols dans le sang.

2°) Précipitation et extraction par certains solvants ~~non~~ miscibles ou non à l'eau

a) Par l'acétone

MASSON (72) utilisa ce solvant pour extraire le dinitrophénol à partir des tissus animaux par trituration au mortier, en présence de sulfate d'ammonium. Le principe de cette technique a été indiqué par CHARONNAT et LACHAUX, cités par TRUHAUT (35) : le composé salin ajouté en quantité suffisante pour saturer la phase aqueuse, permet le relargage

de l'acétone à partir d'un milieu aqueux. Les substances à extraire se trouvent ainsi entraînées dans la phase cétonique.

b) Par la méthyl-éthyl-cétone

PARKER (78) mit au point une méthode d'extraction et de dosage simultanés du DNOC dans le sang, très voisine de la méthode de dosage dans l'urine décrite précédemment p.82 Un prélèvement de 0,1 à 0,2 g de sang est agité avec de la méthyl-éthyl cétone en présence d'un mélange de sels alcalins ($CO_3 Na_2$ + Cl Na - 9 + I).

Cette technique fut légèrement modifiée par la suite par plusieurs auteurs :

HARVEY en 1952 (46) simplifia les manipulations en vue des dosages de routine, ce qui permettait de doser directement le DNOC dans le tube qui avait servi au recueillement du sang par incision de l'oreille ou du doigt.

VAN NOORT (77) apporta une modification permettant d'éliminer certaines interférences dans le dosage du DNOC dans le serum. Après agitation de 1 ml de serum avec 8 ml de méthyl-éthyl-cétone en présence de 1,5 g du mélange de sels alcalins, une partie de la phase cétonique est utilisée pour la mesure de la densité optique à 430 mμ. L'autre partie est additionnée d'une goutte d'acide chlorhydrique à 25 %. Après centrifugation, la nouvelle densité optique correspondant à la coloration naturelle du serum est mesurée. La différence des deux mesures donne la densité optique correspondant au DNOC seul.

BELUJBOHM (7) modifia encore la technique originale de PARKER. 2 ml de sang sont agités avec 10 ml de méthyl-éthyl-cétone en présence de 1 ml de bichromate de potassium à 0,5 % et de 1 g du mélange alcalin de PARKER.

3°) Précipitation par les sels de métaux lourds

BREINLICH (13) utilisa comme pour l'urine, l'acétate de plomb en présence de phosphate de sodium. Le DNOC et ses métabolites étaient ensuite isolés à partir du filtrat soit par entraînement à la vapeur d'eau soit par extraction par l'éther.

TRAVAUX PERSONNELS

Nous avons essayé et comparé plusieurs des techniques que nous venons d'indiquer.

I°) Précipitation par l'acide trichloracetique à 20 %

Nous avons essayé d'appliquer cette technique à l'isolement du DNOC et de ses deux dérivés mono aminés. Nous avons alors constaté qu'une partie du DNOC restait fixée sur le précipité de protéines. En reprenant ce précipité et en l'extrayant au Soxhlet par l'éther de pétrole, nous avons obtenu une bonne récupération du DNOC. Le filtrat d'autre part était traité comme une solution aqueuse de DNOC et d'amino - nitro - O - crésols selon la technique décrite p.77 en exceptant l'hydrolyse acide.

Les pourcentages de récupération obtenus avec cette technique figurent dans le tableau n°IQOn voit que pour le plasma comme pour le sang la récupération du DNOC est bonne. Par contre celle des dérivés aminés acceptable en ce qui concerne le plasma, ne l'est plus pour le sang. Cette différence s'explique facilement par l'augmentation considérable du précipité de protéines dans le cas du sang total, qui fixe ainsi les dérivés aminés dans une plus forte proportion.

2°) Précipitation par l'acide chlorhydrique 2 N

Nous avons essayé de l'appliquer au cas du DNOC et des amino-nitro-O-crésols. Nous avons obtenu des résultats voisins de ceux obtenus avec l'acide trichloracétique. En reprenant le résidu de protéines et en l'extrayant par l'éther de pétrole au soxhlet pendant 2 heures, nous avons obtenu une bonne récupération du DNOC. Mais les pourcentages de récupération des amino - nitro - O - crésols extraits à partir du filtrat selon la technique habituelle avec hydrolyse acide décrite p.77 sont restés faibles et irréguliers.

TABLEAU N° IO

UPERATION A PARTIR DU PLASMA APRES PRECIPITATION DES PROTEINES PAR L'ACIDE TRICHLORACETIQUE

Quantité de plasma en g	DNOC µg introduits	DNOC % récupérat.	Amino 4- Nitro 6- O - Crésol µg introduits	Amino 4- Nitro 6- O - Crésol % récupérat.	Amino 6- Nitro 4- O - Crésol µg introduits	Amino 6- Nitro 4- O - Crésol % récupérat.
I,9	IOO	94	IOO	7I	IOO	72
I,5	IOO	86,5	IOO	48	IOO	69
I,7	IOO	93	IOO	78	IOO	68
		9I%		66 %		70 %

TABLEAU N°II

UPERATION A PARTIR DU SANG APRES PRECIPITATION PAR L'ACIDE TRICHLORACETIQUE

Quantité de sang en g	D N O C µg introduits	D N O C % récupérat.	Amino 4- Nitro 6- O - Crésol µg introduits	Amino 4- Nitro 6- O - Crésol % récupérat.	Amino 6- Nitro 4- O - Crésol µg introduits	Amino 6- Nitro 4- O - Crésol % récupérat.
I,5	50	IOO	50	34	50	37
2,8	IOO	62	IOO	46	50	48
I,3	IOO	98	IOO	46	IOO	46
I,4	IOO	94,5	IOO	36	IOO	58
I,4	IOO	76	IOO	8	IOO	34
		86 %		34 %		45 %

3°) Précipitation par l'acétone

Un certain nombre de solvants organiques miscibles à l'eau ont la propriété de précipiter les protéines sans les dénaturer. C'est le cas de l'acétone.

En partant du principe de la technique de MASSON (72) nous avons mis au point un mode opératoire qui nous a donné des résultats plus satisfaisants que les deux précédentes méthodes.

a) Description de la méthode

Le sang est recueilli sur héparine. Une quantité aliquote est prélevée et introduite dans une fiole jaugée dont le volume est choisi en fonction de l'importance de l'échantillon de sang, de façon à avoir une partie de sang pour 4 parties d'acétone. L'acétone est ajoutée peu à peu dans la fiole en agitant, puis le volume est ajusté à la valeur voulue. Après une dernière agitation, la fiole est laissée au repos pour laisser déposer le précipité de protéines. Celui-ci est ensuite séparé par filtration. Le filtrat contient le DNOC et les amino - nitro - O - crésols.

Un volume déterminé de filtrat est prélevé et soumis à l'évaporation sous vide à 50 - 60°c, jusqu'à ce qu'il ne reste plus dans le ballon que l'eau provenant de l'échantillon de sang. Quand l'échantillon est très important (50 à 100g) ce volume d'eau résiduel est mesuré et rendu 2 N par l'acide chlorhydrique.

Quand il se réduit à 2 ou 3 ml ce résidu est directement repris par 25 ml d'acide chlorhydrique 2 N.

Cette solution aqueuse est soumise à une ébullition sous reflux pendant 2 heures pour libérer le DNOC et ses métabolites de leurs combinaisons éventuelles.

Après refroidissement de l'hydrolysat l'extraction du DNOC et des amino-nitro- O - crésols est effectuée selon la technique indiquée pour les solutions aqueuses de ces composés p. 77

b) Sang témoin

Les substances naturelles du sang n'interfèrent pas dans les dosages colorimètriques. Cependant, lors de la réaction de diazo-copulation sur l'éluat de l'amino 4 - nitro 6 - O - crésol, il peut se produire des opalescences dont il est difficile de se débarrasser. Dans ce cas, et si la réaction est positive le résultat est vérifié en effeetuant un nouveau dosage par la méthode de MEYER.

c) Pourcentage de récupération

Le tableau suivant donne les pourcentages de récupération obtenus en ajoutant des quantités déterminées de DNOC et d'amino - nitro - O - crésols à des échantillons de sang de lapin, et en les extrayant par la méthode que nous venons de décrire.

Les résultats montrent que la technique de déprotéinisation et d'extraction par l'acétone est la plus satisfaisante.

TABLEAU n° I2

RECUPERATION A PARTIR DU SANG APRES PRECIPITATION PAR L'ACETONE

Quantité de sang	DNOC		AMINO4-NITRO 6-CRESOL		AMINO6-NITRO4-CRESOL	
	µg introduits	% récupérat.	µg introduits	% récupérat.	µg introduits	% récupérat
2 ml	80	93	40	52	40	49
I,3 g	40	I00	40	40	40	56
0,6 g	200	72	200	46		
I,3 g	500	88	500	60	500	85
		88 %		50 %		63 %

TRAVAUX ANTERIEURS

GUERBET (40) avait extrait le dinitrophénol et les amino-nitrophénols par macération des pulpes d'organes dans l'alcool pendant au moins cinq jours. La précipitation des graisses était réalisé par addition d'eau et d'acide sulfurique. Après filtration, l'extrait était concentré par distillation en milieu alcalin. Les processus d'extraction se poursuivaient alors comme dans le cas d'une solution aqueuse (voir p.76)

MASSON en I940 (72) modifia cette technique pour extraire quantitativement le dinitrophénol des tissus animaux. L'alcool était remplacé par l'acétone qui présente l'avantage de ne pas dissoudre les phospho-amino-lipides, (CHERAMY cité par TRUHAUT) (35). L'extraction était effectuée en triturant au mortier les organes préalablement hachés, avec plusieurs fractions d'acétone en présence de sulfate d'ammonium permettant le relargage.

Le dosage par la méthode de la dilution limite de la réaction de MEYER (voir p.33) était alors effectué directement sur l'extrait acétonique. Le dinitro phénol et les dérivés aminés étaient donc dosés globalement.

BUZZO (I7) en I949 dans son étude sur le DNOC eut recours à l'entraînement à la vapeur d'eau. Le distillat était ensuite soumis à une extraction par le chloroforme en milieu acide.

En I949, PARKER (78) mit au point sa technique à la méthyl-éthyl-céton pouvant s'appliquer aussi bien aux homogènats de tissus qu'au serum et à l'urine (voir P82) pour l'extraction et le dosage

simultanés du DNOC. Mais pour le dosage des dérivés aminés, il dut modifier sa méthode en I952 (80) et utilisa alors la précipitation par l'acide trichloracétique. Sur le filtrat, les aminonitrophénols étaient caractérisés par la réaction de diazocopulation.

En I963, PROKHOL' KOVA (60) réalisa l'extraction des différents nitrophénols à partir des homogènats de tissus par l'acétate d'éthyle en présence de sulfate de sodium anhydre.

EXTRACTION, SEPARATION ET DOSAGE DU DNOC ET DE SES METABOLITES DANS LES ORGANES

T R A V A U X P E R S O N N E L S

La méthode de MASSON ne permettait que le dosage global du dinitrophénol et de ses dérivés aminés. Elle ne pouvait donc pas être retenue par nous, puisque l'essentiel de notre travail reposait sur la séparation du DNOC et de ses métabolites. Cependant nous avons pensé que la première phase de l'extraction qui, selon MASSON, donnait de très bons pourcentages de récupération pour le dinitrophénol, pourrait être appliquée avec profit au DNOC et aux amino - nitro - O - crésols.

I°) Mise au point de la technique

a) Extraction proprement dite

Dans la technique de MASSON, les organes sont coupés en morceaux aussi petits que possible. Ils sont écrasés au mortier avec I/5 de leur poids, de sulfate d'ammonium et épuisés par l'acétone jusqu'à obtention d'un extrait incolore.

Nous avons essayé de remplacer la trituration au mortier par le broyage au broyeur électrique, mais nous avons obtenu un meilleur

écrasement des cellules en ajoutant un peu de sable de Fontainebleau à la pulpe d'organe et en faisant une trituration au mortier.

Nous avons déterminé le nombre d'extractions nécessaires pour obtenir une bonne récupération.

En traitant l'échantillon analysé par cinq fois son poids d'acétone, l'extraction peut être considérée comme maximale.

b) Précipitation des graisses

La précipitation des graisses est obtenue en diluant l'extrait acétonique avec le I/3 de son volume d'eau distillée et en acidifiant le liquide résultant, avec quelques gouttes d'acide sulfurique à 20 % en volumes. Aprés décantation pendant I nuit au réfrigérateur, le précipité de graisse est séparé par filtration sur papier.

c) Evaporation de l'acétone

Le filtrat précédent est soumis à l'évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif à 40 - 50°c. Pour éviter l'entraînement d'une petite partie du DNOC avec la vapeur d'eau vers la fin de l'évaporation, il est nécessaire d'alcaliniser très légèrement l'extrait avec quelques gouttes d'ammoniaque concentrée. Le DNOC passe ainsi à l'état de dinitrocrésolate d'ammonium non volatil, et le léger excés d'ammoniaque passé en solution est rapidement évaporé au début de la phase d'évaporation.

d) Hydrolyse acide - Séparation des métabolites - Dosage

L'analyse se poursuit comme dans le cas du sang.

L'amino 4 - nitro 6 - O - crésol peut être dosé indifféremment par diazocopulation, ou par la réaction de Meyer.

Le dosage colorimètrique de l'amino 6 - nitro 4 - O - crésol se fait par une seule lecture spectrophotomètrique (voir dosage dans l'urine).

2°) Description de la technique proprement dite

Une fois prélévés, les organes sont pesés puis coupés en fins morceaux dans un mortier.

Ils sont alors triturés avec le I/5 de leur poids de sulfate neutre d'ammonium et 2 à 3 cuillièrées de sable de Fontainebleau.

Cinq extractions sont effectuées chacune par un volume d'acétone égal au poids de l'échantillon analysé. A chaque extraction le contenu du mortier est entraîné sur un entonnoir de Buchner monté sur une fiole à vide. Le résidu de filtration est alors repris et remis dans le mortier pour l'extraction suivante.

Les différents extraits sont réunis dans une éprouvette graduée ainsi que les fractions acétoniques de rinçage de la fiole à vide. Le volume ainsi atteint est noté.

Un volume d'eau distillée égal au I/3 du volume de l'extrait acétonique est ajouté, ainsi que la quantité nécessaire d'acide sulfurique à 20 % pour avoir un pH de I à 2. Ce liquide est laissé une nuit au réfrigérateur.

Le lendemain, le volume de l'extrait dans l'éprouvette étant relevé, la séparation du précipité de graisses est réalisée par filtration sur papier. Une quantité déterminée du filtrat est prélevée et transvasée dans le ballon de l'évaporateur rotatif.

l'acidité due à l'acide sulfurique est neutralisée par quelques gouttes d'ammoniaque concentrée à 22° Bé, puis l'évaporation sous vide de l'acétone est effectuée au moyen d'un évaporateur rotatif, à 40 - 50°c.

Quand le volume du résidu aqueux est à peu près égal à celui de l'eau ajoutée pour la précipitation des graisses, l'évaporation est arrêtée.

Le résidu aqueux est transvasé dans une éprouvette graduée et son volume est relevé. La quantité d'HCl concentré nécessaire pour le rendre acide 2 N est alors calculée et ajoutée. Le liquide est ensuite filtré quantitativement si nécessaire, puis transvasé dans un ballon à col rodé adaptable à un réfrigérant ascendant.

L'hydrolyse acide est conduite pendant 2 heures par ébullition à reflux.

Après refroidissement l'hydrolysat est transvasé quantitativement dans une ampoule à décantation.

L'analyse se poursuit ensuite comme dans le cas d'une solution aqueuse (voir p.77)

3°) Modification pour l'extraction des tissus graisseux

L'extraction par l'acétone, même en présence de sulfate d'ammonium est impossible car la phase liquide se sépare très difficilement. En utilisant l'acétone aqueux contenant 40 % d'eau nous n'avons pas obtenu d'émulsions gênantes.

La suite de l'analyse est effectuée normalement selon la technique décrite ci-dessus.

4°) Organes témoins

Nous n'avons pas observé d'interférences dans les dosages colorimètriques, avec les substances naturelles des tissus animaux, extraits selon la technique décrite ci-dessus.

5°) Pourcentages de récupération

Les déterminations ont été effectuées sur du foie de génisse auquel avaient été ajoutés les trois composés nitrés, dans des concentrations variant de I3 à 25 µg/g.

Les pourcentages de récupérations ont été les suivants.

DNOC	59 %
Amino 4- nitro 6 O crésol	28 %
Amino 6- nitro 4 O crésol	42 %

EXTRACTION ET DOSAGE DU DNOC A PARTIR DES TISSUS VEGETAUX

TRAVAUX PERSONNELS

Nous avions prévu d'étudier la toxicité du DNOC sur le gibier, en rapport avec les taux de résidus de ce desherbant sur les céréales.

Pour la détermination de ces résidus, nous avons été amenée à mettre au point une méthode d'extraction du DNOC à partir des tissus végétaux.

I°) Principe

Le DNOC sous sa forme phénolique est très peu soluble dans l'eau. Par contre son sel d'ammonium s'y dissout très facilement. Une solution diluée d'ammoniaque a donc été choisie comme solvant d'extraction.

L'extrait végétal ainsi obtenu est fortement coloré par les substances naturelles du blé. Une extraction par l'éther de pétrole en milieu acide, permet de séparer le DNOC sous sa forme phénolique, des substances interférentes.

L'extrait éthéré est évaporé en présence de quelques ml d'eau alcalinisée afin d'éviter les pertes en fin d'évaporation.

Le dosage est effectué par la méthyl-éthyl-cétone selon la méthode employée pour les déterminations dans le sang, l'urine, et les organes (voir p.36)

2°) Technique

a) Extraction

Un échantillon de blé en herbe de IO à 20 g, est exactement pesé et introduit dans un erlenmayer. Un volume d'eau ammoniacale égal à IO à 20 fois le poids de l'échantillon est exactement mesuré et ajouté. On utilise pour cela une solution d'ammoniaque à 22° Bé, à 5 % dans l'eau. Les feuilles de blé doivent baigner largement dans le solvant. On laisse macérer une nuit. Le lendemain le flacon est agité pendant 5 minutes à l'agitateur électrique, pour homogèneiser l'extrait. Celui-ci est ensuite filtré rapidement sur un tampon de laine de verre.

Une quantité aliquote du filtrat est prélevée et acidifiée par HCl jusqu'à pH I. Si un précipité se produit, celui-ci est alors séparé par filtration sur laine de verre.

Le DNOC est alors extrait six fois par une volume d'éther de pétrole égal au I/5° du volume de la phase aqueuse. Les six fractions d'éther sont réunies et lavées 3 fois avec 5 à IO ml d'eau distillée. Les eaux de lavage sont rejetées et la phase éthérée est filtrée sur coton hydrophile pour retenir les gouttelettes d'eau. L'ampoule à décanter, l'entonnoir et le tampon de coton sont rincés plusieurs fois avec quelques ml d'éther de pétrole. Toutes les fractions éthérées sont réunies dans le même erlenmeyer, puis évaporées au bain-marie en présence de 5 ml d'une solution à IO % dans l'eau d'un mélange $CO_3\ Na_2$ + Cl Na (I + 9).

L'évaporation est arrêtée lorsqu'il ne reste plus que la phase aqueuse dans l'erlenmeyer.

b) Dosage

Le contenu de l'erlenmeyer est versé dans une fiole jaugée de 10,25 ou 50 ml. Le volume est ajusté avec la solution alcaline précitée, dont quelques fractions auront été utilisées pour rincer l'erlenmeyer.

5 ml de cet extrait sont prélevés et introduits dans un tube à essai.

5 ml de méthyl-éthyl-cétone sont ajoutés. Le tube est agité fortement. La densité optique de la phase cétonique est lue à 430 mμ par rapport à la méthyl-éthyl-cétone.

Une gamme étalon est préparée de la même manière avec des solutions contenant 1,2,3,4 μg/ml de DNOC.

3°) Blés témoins

Dix déterminations ont été faites sur du blé cultivé en serre Dans huit cas les valeurs des blés témoins étaient inférieures ou égales à 0,1 ppm et dans deux cas égales à 0,2 ppm.

Par rapport à la concentration élevée des résidus de DNOC sur les blés après les traitements, ces valeurs ont été considérées comme négligeables.

4°) Pourcentages de récupération

Sept déterminations ont été effectuées sur des blés témoins auquels avaient été ajoutées des quantités de dinitro-O-crésolate d'ammonium variant de 20,5 à 70 ppm. Les pourcentages de récupération se sont répartis de 87,5 à 98,0 % avec une moyenne générale de 95,6 %

CONCLUSIONS

Nous avons donc d'abord mis au point un processus d'extraction du DNOC et de ses deux dérivés mono aminés à partir d'une solution aqueuse. Compte tenu de la relative fragilité des amino-nitro-O-crésols et en particulier de celle du dérivé aminé en para, nous avons estimé la méthode satisfaisante.

Cette technique a été appliquée à l'urine de lapin avec une légère modification au cours du dosage colorimètrique pour éviter les interférences avec certaines substances naturelles des urines.

Précédée d'une extraction par l'acétone, elle nous a permis par ailleurs de doser le DNOC et ses dérivés dans le sang et les organes. Dans ce dernier cas les pourcentages de récupération sont moins bons, surtout en ce qui concerne les dérivés aminés.

Les autres techniques de déprotéinisation et d'extraction ne nous ont pas apporté de meilleurs résultats.

TABLEAU n°I3

	POURCENTAGES DE RECUPERATION			
	Solution aqueuse	Urine	Sang	Organes
DNOC	95	82	88	59
Amino-4-Nitro 6- O - crésol	74	43	50	28
Amino-6-Nitro 4- O - crésol	88	50	63	42

Enfin une méthode d'extraction du DNOC à partir de feuilles de blé a été mise au point. Elle permet de retrouver 95 % du DNOC introduit.

TROISIEME PARTIE

ETUDE DU METABOLISME DU DNOC CHEZ LE LAPIN

Nos travaux ont porté sur les déterminations suivantes :

I) - Concentrations du DNOC et de ses métabolites dans le sang.

2) - Cinétique urinaire du DNOC et de ses métabolites.

3) - Relations entre l'évolution des concentrations sanguines et l'élimination urinaire du DNOC.

4) - Recherches du DNOC et de ses métabolites dans les fécès.

5) - Concentrations du DNOC et de ses métabolites dans les principaux organes.

6) - Transformations du DNOC et de ses métabolites au cours de la putréfaction des tissus.

7) - Conclusions.

UDE DES CONCENTRATIONS DU DNOC DANS LE SANG CHEZ DIFFERENTES ESPECES.

T R A V A U X A N T E R I E U R S

En I95I, PARKER (79) avait suivi l'élimination du DNOC dans le sérum de rat, de lapin, de chat et de chien, après injection sous-cutanée. Il avait observé que les temps nécessaires pour que la concentration de DNOC dans le sérum diminue de moitié étaient les suivants :

- lapin 3 h
- rat I5 h
- chat 20 h
- chien 36 h

En I953 (57) et I954 (59) KING et HARVEY ont également étudié la vitesse de disparition du DNOC dans le sang chez le rat, ils ont observé que la concentration du DNOC augmentait plus rapidement après injection intrapéritonéale qu'après sondage stomacal. De plus, les valeurs maxima des concentrations étaient plus fortes dans le cas de l'administration par voie intrapéritonéale.

Par ailleurs, ils ont comparé les vitesses d'élimination du DNOC, à partir du sang chez le lapin, le rat et l'homme, après administration par voie stomacale. C'est le lapin qui élimine le plus rapidement (2 jours), puis le rat (8 jours) puis l'homme (38 jours).

Ces différents auteurs ont effectué les dosages du DNOC suivant la méthode de PARKER (78) qui ne permet pas de doser les métabolites aminés. Nous avons donc pensé qu'il pourrait être intéressant de voir si le sang des lapins traités contenait de l'amino-6-nitro-4-o-crésol ou de l'amino-4-nitro-6-o-crésol, et comment ces composés étaient éliminés.

TUDE DES CONCENTRATIONS DU DNOC DANS LE SANG CHEZ LE LAPIN.

EXPERIMENTATION PERSONNELLE

I°) - Méthode.

L'administration a été faite par sondage stomacal après un jeûne de 15 heures, en utilisant une solution de DNOC à 5 ou 10 mg/ml dans l'eau alcalinisée par un mélange de carbonate de sodium et de chlorure de sodium selon HARVEY (57-58) de façon à permettre la dissolution du DNOC.

Les prélèvements de 2 à 4 g de sang ont été effectués à l'oreille et recueillis sur héparine.

L'analyse a été faite selon la méthode décrite précédemment.

2°) - Résultats.

Six lapins mâles ont été mis en expérience. Des doses de 10-15 et 18 mg/kg de DNOC ont été administrées. La recherche du DNOC et de ses métabolites a été effectuée à différents temps après l'administration. Nous avons observé les faits suivants :

a) - Nature des composés identifiés.

En aucun cas les métabolites aminés n'ont été identifiés, quelle que soit la dose de DNOC administrée. Nous avons alors envisagé l'hypothèse suivante : ces composés étaient peut-être présents dans le sang, mais en quantité non décelable dans des prélèvements de 2 à 4 grammes.

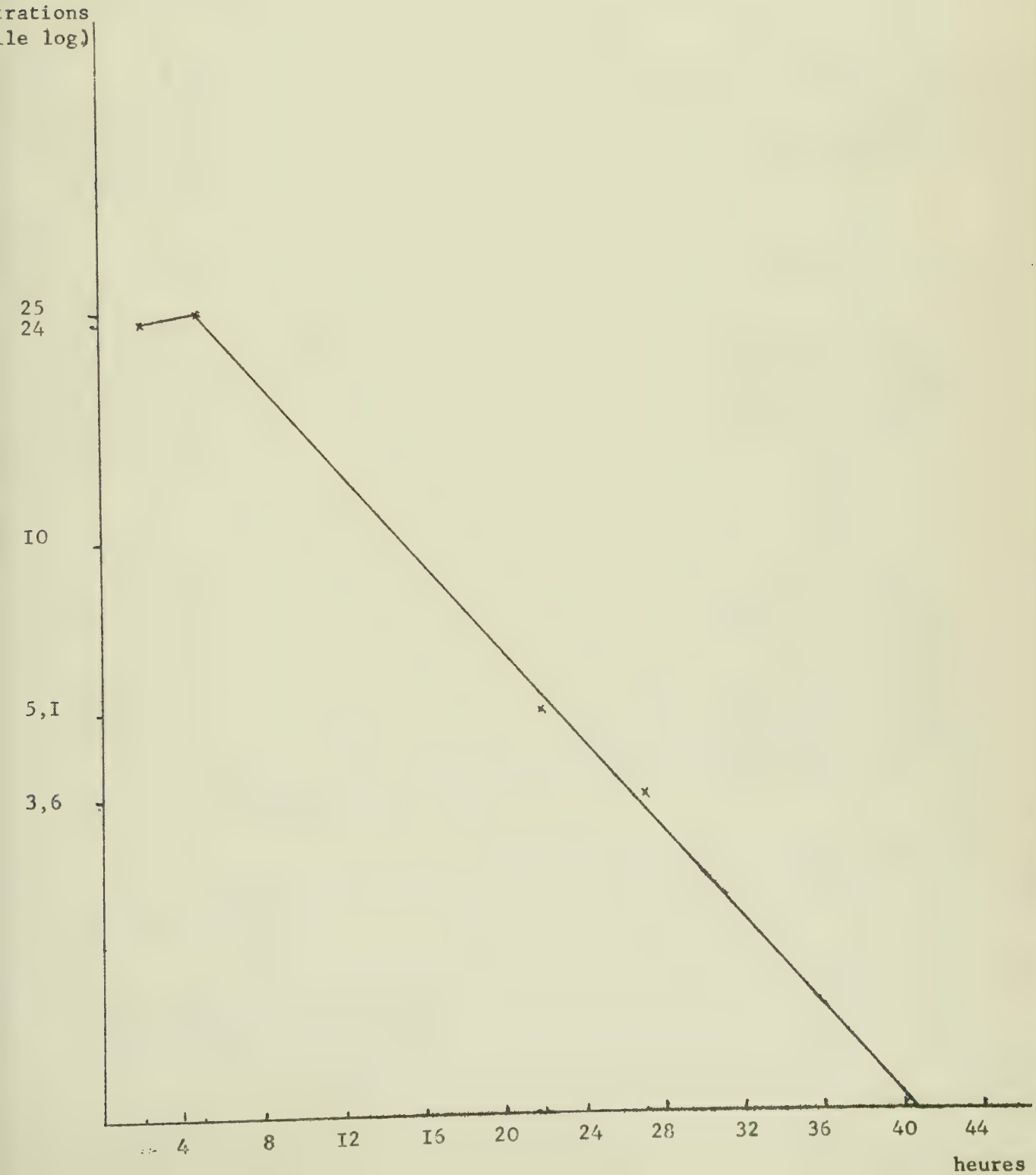
Deux lapins, ayant reçu 10 mg/kg de DNOC, ont donc été saignés au moment de la mise à mort, ce qui nous a permis d'effectuer les analyses sur des prélèvements beaucoup plus importants : 49 et 50 g. Mais dans aucun de

TABLEAU N° I4

CONCENTRATIONS DU DNOC DANS LE SANG DES LAPINS

N° des Lapins	Dose administrée	Temps écoulé entre l'administration et le prélèvement	DNOC µg/g dans le sang
I	I0 mg/kg	2 h	24
		5 h	25
		22 h	5,I
		27 h	3,6
		5I h	0
II	I0 mg/kg	5 h	34
III	I0 mg/kg	3 h 45	23
IV	I5 mg/kg	6 h	24
		24 h	8,8
		54 h	0
V	I5 mg/kg	5 h 30	27
		30 h	0
VI	I8 mg/kg	2 h	50,5

Graphique n° I : Elimination du DNOC dans le sang d'un lapin ayant reçu
IO mg/kg de DNOC



ces deux cas, nous n'avons trouvé de dérivés aminés.

b) - Effet d'une dose sublétale. - Trente à cinquante heures après l'administration, le DNOC n'est plus décelable dans le sang.

Entre 2 heures et 6 heures après l'administration la concentration du DNOC reste à peu près constante (25 à 35 µg/g). A partir de ce moment-là, l'élimination se fait de telle façon que les logarithmes des concentrations sont inversement proportionnels aux temps (voir graphique N° I)

Ces résultats correspondent à ceux de KING et HARVEY (57).

c) - Effet d'une dose létale. - Deux heures après l'administration de I8mg/kg de DNOC et une heure avant la mort, un prélèvement de sang a été effectué à l'oreille. La concentration de DNOC a été trouvée nettement plus élevée que dans le cas des intoxications non mortelles : 50 µg/g au lieu de 25 à 30µg/g

3°) - Conclusions.

a) - Après administration par voie orale, la concentration du DNOC dans le sang chez le lapin atteint rapidement un palier et s'y maintient pendant 5 à 6 heures. Dans nos expériences elle a alors été de 25 à 35 µg/g pour des doses sublétales de I0 à I5 mg/kg et de 50µg/g pour une dose mortelle de I8 mg/kg. Si l'on tient compte des pourcentages de récupération de la méthode (33 %), ces concentrations atteignent 28 à 39 µg/g dans un cas et 56 µg/g dans l'autre.

b) - Deux jours après l'administration, le DNOC n'est plus décelable dans le sang.

c) - En aucun cas les dérivés mono-aminés du DNOC n'ont pu être identifiés dans le sang.

ETUDE DES CONCENTRATIONS DU DNOC ET DE SES METABOLITES DANS L'URINE.

T R A V A U X A N T E R I E U R S

En I95I, PARKER (7) avait étudié l'excrétion urinaire du DNOC chez le lapin et chez le chien. La diminution du DNOC dans le sang étant beaucoup plus lente chez ce dernier, il avait pensé que l'excrétion devait également être différente. Or, il constata que chez le lapin comme chez le chien, l'urine recueillie pendant 24 heures après l'administration ne contenait que 4 à I0 % de la dose de DNOC administrée.

En I953 KING et HARVEY (57) ont repris cette question. Ils ont suivi l'élimination du DNOC dans l'urine du lapin. Ils ont observé que la quantité de DNOC dans l'urine tombait de 2 à 3 mg après 5 heures, à 0,27 à 0,02 mg au bout de 48 heures. Après 96 heures on ne retrouvait plus de DNOC du tout. A ce moment-là, la quantité totale de DNOC excrétée était de 6 à 9 % par rapport à la dose totale administrée (34 à 44 mg par lapin).

En I953, SMITH, SMITHIES et WILLIAMS (I0I) ont orienté les recherches vers l'identification des métabolites urinaires du DNOC chez le lapin, en utilisant la chromatographie sur papier. L'analyse a été faite sur le mélange des urines recueillies pendant les deux jours qui ont suivi l'administration.

Les lapins avaient reçu des doses élevées de DNOC (20 à 30 mg/kg). Moins de 20 % de la dose administrée a été retrouvé dans les urines, sous les formes suivantes :

- DNOC inchangé	5 à 6 %	DNOC total 6 à 7 %
- DNOC conjugué	I %	
- Acétamido-6-nitro-4-o-Crésol libre	I,5 %	Amino-6-nitro-4-crésol total II à I2 %
- Acétamido-6-nitro-4-o-crésol conjugué à l'acide glycuronique	I0 à II %	

- Amino-4-nitro-6-o-crésol Traces
- Acide amino-5-nitro-3-salicylique Traces

Nous avons pensé qu'il pourrait être intéressant de suivre l'excrétion urinaire au cours du temps non seulement du DNOC, mais aussi de ses principaux métabolites. Il était également nécessaire de voir si le métabolisme se faisait de la même manière quelle que soit l'importance de la dose administrée.

ETUDE DE LA CINETIQUE URINAIRE DU DNOC ET DE SES METABOLITES CHEZ LE LAPIN.

E X P E R I M E N T A T I O N P E R S O N N E L L E

I°) - Méthode.

a) - Administration.

Nous avons utilisé le sondage stomacal après un jeûne de 15 heures, avec une solution de DNOC à 5 ou 10 mg/ml dissous dans l'eau alcalinisée selon HARVEY (57-58).

b) - Recueillement de l'urine.

Chaque lapin en expérience restait sous surveillance constante dans une cage spécialement adaptée au recueillement de l'urine. Celle-ci s'écoulait directement dans une éprouvette graduée tandis que les fécès étaient retenues sur un grillage fin.

A chaque miction l'urine était prélevée et immédiatement acidifiée pour éviter des transformations du DNOC (voir p. 83).

La nuit, l'urine était recueillie directement dans 10 ml d'acide chlorhydrique 10 N.

c) - Technique analytique.

Nous avons appliqué la méthode décrite p. 83 qui permet de doser le DNOC, l'amino-6-nitro-4-o-crésol et l'amino-4-nitro-6-o-crésol, libérés de leurs différentes combinaisons.

2°) - Résultats.

L'élimination urinaire du DNOC a été étudiée en fonction du temps et de la dose, sur I0 lapins mâles.

Six d'entre eux ont été utilisés pour suivre l'élimination urinaire, jusqu'à disparition totale du DNOC de l'urine.

Les quatre autres destinés à l'analyse des organes ont été sacrifiés ou sont morts quelques heures après l'administration. L'urine a été recueillie avant la mort ou au moment de la dissection.

Les doses administrées ont été les suivantes :

Nombre de lapins	Dose administrée
I	5 mg/kg
4	I0 mg/kg
3	I5 mg/kg
I	I8 mg/kg (mortelle)
I	20 mg/kg (mortelle)

Dans les tableaux n° I5 à 20 sont indiquées les quantités de DNOC, d'amino-4-nitro-6-o-crésol et d'amino-6-nitro-4-o-crésol excrétés par les six lapins chez lesquels nous avons suivi l'élimination du DNOC jusqu'à disparition totale dans l'urine.

TEMPS	D N O C			AMINO4- NITRO6 - CRESOL			AMINO 6- NITRO 4- CRESOL			TOTALITE DES DERIVES EXPRIMES EN DNOC	
	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg	% d'excrétion
3 h 30	3,9	588	3,39	0,5	78	0,53	0,3	65	0,44	756	4,3
26 h	7,5	577	3,33	I,4	II2	0,75	0,9	72	0,49	793	4,5
33 h	3,2	346	2	0,4	52	0,35	0,2	28	0,I9	440	2,5
2 jours	I,3	25I	I,45	0	0	0	0	0	0	25I	I,4
2,5 jours	0,3	48	0,27	0	0	0	0	0	0	48	0,27
3 jours	0,I	IO	0,05	0	0	0	0	0	0	IO	0,05
3,5 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL		I820	IO,3		242			I65			
TOTAL EXPRIME EN DNOC		I820	IO,3		284	I,6		I94	I,I	2298	I3

ELIMINATION URINAIRE DU DNOC CHEZ UN LAPIN AYANT RECU IO mg/kg, soit 27,3 mg de DNOC

TEMPS	DNOC			AMINO-4-NITRO-6-O-CRESOL			AMINO-6-NITRO-4-O-CRESOL			TOTALITE DE PRODUITS EXPRIMES EN DNOC	
	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg	% d'excrétion
2h 30	I08	I739	6,4	9	I45	0,66	79,5	I272	5,5	3407	I2,5
6heures	32,2	935	3,4	2,4	72	0,3I	27,I	787	3,4	I946	7,I
I jour	22,9	2750	I0,I	I,6	I97	0,85	I3,2	I59I	6,9	4856	I7,8
32 heures	I,3	I09	0,4	0	0	0	0,5	4I	0,I7	I57	0,57
2 jours	0,I	23	0,08	0	0	0	0,2	27	0,II	54	0,I9
2,5 jours	0,07	I2	0,04	0	0	0	0	0	0	I2	0,04
3 jours	0,I4	36	0,I3	0	0	0	0	0	0	36	0,I3
3,5 jours	0,03	6	0,02	0	0	0	0	0	0	6	0,02
4 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL		56I0	20,5		4I4			37I8			
TOTAL exprimé en DNOC		56I0	20,5		487	I,8		4379	I6	I0474	38,3

TEMPS	DNOC			AMINO 4- NITRO 6- CRESOL			AMINO 6 - NITRO 4 - CRESOL			Totalité des dérivés exprimés en	
	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg	% d'excrétion
Ihre	7,2	480	0,98	0	0	0	4,4	290	0;70	821	I,6
I,5jour	I8,3	3200	6,50	3,I	560	I,35	32	5760	I3,96	I0644	2I,9
2 jours	4,8	300	0,6I	0,7	47	0,I3	7,8	488	I,I8	930	I,9
2,5jours	I,3	97	0,I9	0,2	I8	0,04	I,I	84	0,20	2I7	0,44
3 jours	0,08	I0	0,02	0	0	0	0,07	9	0,02	20	0,04
4 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL		4087			625			663I			
TOTAL EXPRIME EN DNOC		4087	8,3		735	I,5		78I0	I6	I2632	25,8

TEMPS	D N O C			AMINO-4-NITRO-6-CRESOL			AMINO-6-NITRO-4-CRESOL			TOTALITE DES DERIVES EXPRIMES EN DNOC	
	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg	% d'excrétion
I jour	I24	9696	I7	7,8	6I8	I,2	7I	5592	II,5	I7 008	29,7
2 jours	I5,4	742	I,3	3,2	I58	0,32	I2,3	594	I,22	627	2,8
2,5 jours	6,3	202	0,35				2,7	89	0,I8	306	0,53
3 jours	I,2	I42	0,42							I42	0,24
4 jours	0,2	49	0,08							49	0,08
TOTAL		I0 83I	I8,9		774			6275			
TOTAL EXPRIME EN DNOC		I0 83 I	I8,9		9II	I,5		7390	I2,9	I9 I32	33,3

TEMPS	D N O C			AMINO-4-NITRO-6-CRESOL			AMINO - 6-NITRO-4-CRESOL			TOTALITE DES DERIVES EXPRIMES EN DNOC	
	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg	% d'excrétion
7 heures	II4	5040	7,4I	I3,5	594	I,02	I46	6457	II I0	I3 345	I9,5
I jour	25,2	4285	6,30				0,5	85	0,I4	4385	6,4
I,5 jour	2,4	326	0,47				0,3	5I	0,08	386	0,55
2 jours	I,I	I26	0,I8				0,I	20	0,03	I49	0,2I
2,5 j(a)											
3 jours	0,3	44	0,06								
TOTAL		9821			594			66I3			
TOTAL EXPRIME EN DNOC		9821	I4,4		699	I,02		7789	II,3	I8 265	26,6

(a) urine perdue

ELIMINATION URINAIRE DU DNOC CHEZ UN LAPIN A ANT RECU I5 mg/kg SOIT 66 mg de DNOC

TEMPS	D N O C			AMINO-4-NITRO-6-CRESOL			AMINO-6-NITRO-4-CRESOL			TOTALITE DES DERIVES EXPRIMES EN DNOC	
	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg	% d'excrétion
I h 30	25	275	0,4I				29	320	0,[illegible]	65I	0,97
I jour	I77	9600	I4,54	37	2000	3,5	I22	6925	I2,3	20II3	30,3
2 jours	2I	2900	4,39	0,3	44	0,07	I	I50	0,26	3I27	4,6
3 jours	I0	500	0,75	I,8	93	0,I6	II,5	577	I,02	3288	I,9
4 jours	2	II6	0,I7				II,5	93	0,I6	225	0,33
TOTAL		I3 39I			2I37			8065			
TOTAL EXPRIME EN DNOC		I3 39I	20,I		25I7	3,7		9500	I4,3	25 404 ======	38,I =====

EXCRETION URINAIRE DU DNOC CHEZ QUATRE LAPINS MORTS OU SACRIFIES QUELQUES HEURES APRES L'ADMINISTRATION

DOSE DE DNOC ADMINISTREE		TEMPS	DNOC			AMINO-4-NITRO-6-O CRESOL			AMINO-6-NITRO-4-O CRESOL			TOTALITE DES DERIVES EN DNOC	
mg/kg	Totale mg		µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg/ml	Totalité µg	% d'excrétion	µg	% d'excretion
I0	37	3h 45	6	I724	4,65	0,48	I39	0,44	4	II46	3,64	3237	8,7
I0	50	5 h	I07	8566	I7,II	2	I55	0,36	I6,8	I350	3,I8	I0338	20,6
I8	90	3 h	2,4	480	0,53	0,08	I7,6	0,02	5,7	II54	I,5	I860	2
20	65,5	2h 30	8,8	460	0,70	2,4	I28	0,22	I3	677	I,2I	I407	2,I

a) - Temps d'élimination.

Les temps nécessaires pour que le DNOC et ses deux métabolites ne soient plus détectables dans l'urine ont été les suivants :

TABLEAU N° 22

Dose administrée en mg/kg	Durée de l'élimination en jours	Quantités trouvées dans la dernière urine analysée en µg.	
		DNOC	Amino-6-nitro-4-o-crésol
5	3,5	0	0
I0	4	0	0
I0	4	0	0
I5	⩾4	II6	93
I5	⩾3	44	0
I5	⩾4	49	0

Au bout de 3 à 4 jours, on ne retrouve pratiquement plus de DNOC ni de dérivés nitro-aminés dans les urines des lapins intoxiqués par 5 à I5 mg/kg. Les quantités résiduelles trouvées, sont alors inférieures à 0,4 % de la dose administrée. On peut donc considérer que le temps d'élimination est sensiblement le même, quelle que soit la dose administrée.

b) - Nature des métabolites urinaires.

Dans chacun des dix cas étudiés, nous avons identifié les 3 composés que nous nous étions proposés de rechercher :

- DNOC
- Amino-4-nitro-6-o-crésol
- Amino-6-nitro-4-o-crésol

SMITH, [illegible] ayant déjà observé que ces composés se trouvaient dans l'urine sous forme libre et combinée, nous n'avons pas cherché à renouveler systématiquement ces observations. Cependant lors d'une expérience où un lapin avait reçu une dose mortelle de I8 mg/kg, nous avons analysé, avant et après hydrolyse, l'urine prélevée dans sa vessie, les résultats ont été les suivants :

	Formes libres	Formes combinées
DNOC	46 %	54 %
Amino-6-nitro-4-o-crésol	45 %	55 %

c) - Pourcentage d'élimination.

Dans les six cas où nous avons suivi l'élimination urinaire jusqu'à disparition totale du DNOC, nous avons fait le bilan des quantités éliminées (tableau n° 23). Les quantités de dérivés aminés ont été transformées en quantités équivalentes de DNOC, en appliquant le coefficient tiré des poids moléculaires :

$$\frac{\text{Poids moléculaire du DNOC}}{\text{Poids moléculaire de l'amino-nitro-o-crésol}} = \frac{198,13}{168,14} = 1,178$$

Nous avons ainsi calculé les pourcentages de DNOC éliminé par rapport à la quantité administrée. Si l'on consulte le tableau n° 23 , il apparaît que pour des doses de I0 à I5 mg/kg, le lapin élimine 25 à 40 % de la dose administrée, soit sous forme de DNOC, soit sous forme de métabolites nitro aminés. Dans le cas d'une dose très faible (5 mg/kg) n'ayant provoqué aucun

Dose de DNOC administrée		Dose totale excrétée		Dose excrétée dans les premières 24 heures		
mg/kg	Dose totale en mg	mg	%	mg	% I	% II
5	I7,3	2,3	I3	I,54	8,9	67
IO	48,6	I2,6	25,9	II,4	23	9I
IO	27	IO,4	38,3	IO,2	37	96
I5	66	25,4	38	20,7	3I	82
I5	68	I8,2	26,6	I7,7	25	97
I5	57	I9	33,3	I7	29	89

I - par rapport à la dose adminitrée

II - par rapport à la dose excrétée

symptôme d'intoxication, I3 % seulement de la dose ont été retrouvés dans les urines.

Nous avons également observé, que 70 à 90 % de l'élimination se faisaient pendant les premières 24 heures suivant l'administration.

Le pourcentage d'élimination n'ayant jamais excèdé 40 %, (6I % en tenant compte du pourcentage de récupération) nous avons naturellement envisagé l'hypothèse d'un stockage d'une partie du DNOC ou de ses métabolites dans les tissus.

Après avoir suivi l'élimination urinaire de I0 mg/kg chez deux lapins, nous les avons sacrifiés et avons analysé leurs différents organes :

DNOC et Dérivés

	Ier lapin	2ème lapin
Sang	0	0
Poumons	0	0
Foie	0	0
Reins	0	0
Glandes surrénales	0	0
Encéphale	0	0
Moelle osseuse	0	0
Graisse	0	0
Gonades mâles	20,8 µg (soit I,I ppm)	0
Rate		0
Thyroïde		0

Sept jours après l'administration du DNOC, il n'a été trouvé de DNOC que dans les gonades et seulement dans le cas d'un des deux lapins. On ne peut donc pas parler de stockage du DNOC ou de ses métabolites dans les tissus.

L'hypothèse d'une élimination par les fécès a été également envisagée. Lors de l'étude de l'excrétion urinaire du DNOC chez un lapin qui avait reçu une dose de 5 mg/kg, nous avons également analysé les fécès. Ni le DNOC ni les nitro-amino-o-crésols n'ont été identifiés. Voir p. I30

d) - Concentrations relatives des métabolites.

Nous avons comparé les concentrations relatives des métabolites en fonction de la dose administrée et en fonction du temps écoulé après l'administration.

Si l'on considère les quantités totales de chacun des 3 composés excrétées pendant toute la période d'élimination urinaire, on constate que les pourcentages d'excrétions sont les suivantes :

TABLEAU N° 24

Dose administrée mg/kg	Pourcentages d'excrétion du DNOC		
	Sous forme de DNOC	Sous forme de Amino-4-nitro-6-o-crésol	Sous forme de Amino-6-nitro-4-o-crésol
5	I0,3	I,6	I,I
I0	8,3	I,5	I6
I0	20,5	I,8	I6
I5	20	3,7	I4
I5	I4,4	I	II,3
I5	I3,9	I,5	I2,9

TABLEAU N° 25

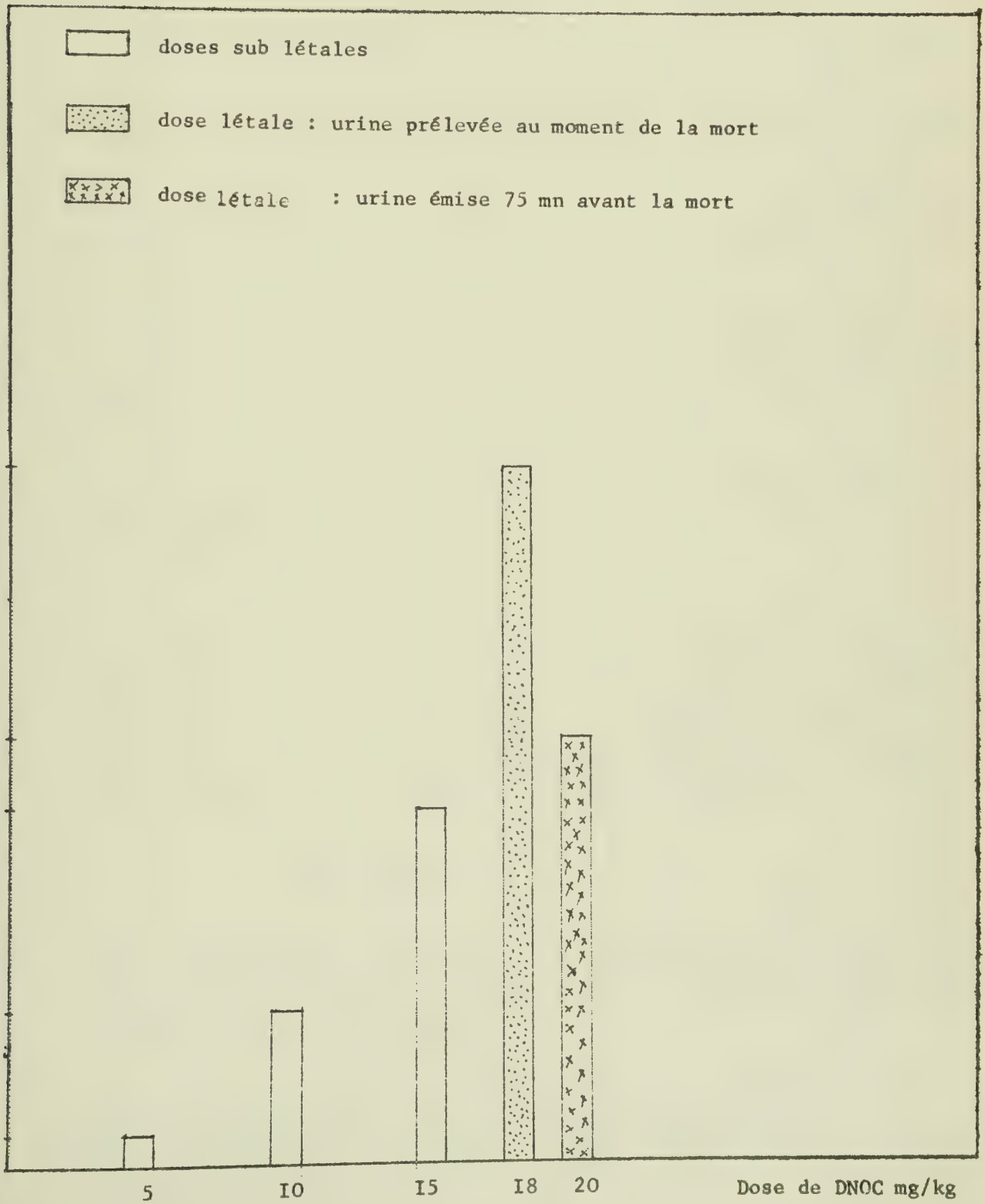
Rapport des quantités de DNOC et d'amino-6-nitro-4-o-crésol dans l'urine, dans les sept premières heures après l'administration.

Dose de DNOC administrée en mg/kg	Temps écoulé après l'administration	DNOC dans l'urine µg	Amino-6-nitro-4-o-crésol dans l'urine µg	Rapport Amino-6-nitro-4-o-crésol / DNOC
5	3h 30	588	65	0,II
I0	5h	8566	I350	0,I5
I0	Ih	480	290	0,60
I0	3h 45	I724	II46	0,66
I0	2h 30	I739	I272	0,73
I5	Ih 30	275	320	I,I6
I5	7h	5040	6439	I,28
I8	3h (a)	480	II54	2,40
20	2h 30 (b)	460	677	I,47

(a) - au moment de la mort

(b) - Ih I5 avant la mort

Graphique n° 2 : Valeurs du rapport $Q = \frac{ANOC}{DNOC}$ dans l'urine, en fonction de la dose de DNOC administrée.



On voit donc que :

- La quantité d'amino-4-nitro-6-o-crésol est toujours peu importante.

- Pour une dose faible de 5 mg/kg, le DNOC est essentiellement excrété sous forme de DNOC.

- Pour les doses de I0 à I5 mg/kg, les dérivés aminés constituent une forme d'élimination presque aussi importante que le DNOC lui-même.

Et même, dans l'un des cas l'élimination s'est surtout faite sous forme de dérivés aminés (DNOC 8 %, dérivés aminés I7 %).

Il semble donc que la métabolisation du DNOC en dérivés aminés se fasse plus intensément lorsque les doses administrées sont plus importantes.

Cette observation est encore plus nette si l'on considère l'élimination pendant les sept premières heures qui suivent l'administration, c'est-à-dire pendant la phase aigüe de l'intoxication.

Dans le tableau n° 25 nous avons exprimé le rapport des quantités de DNOC et d'amino-6-nitro-4-o-crésol présentes dans les urines émises entre Ih et 7h après l'administration. On peut constater que la valeur de ce rapport croît en même temps que la dose administrée augmente. De 0,II lors d'une intoxication bénigne par 5 mg/kg, il a atteint 2,40 lors d'une intoxication mortelle par I8 mg/kg. (graphique n° 2)

3°) - Conclusions.

I) - L'élimination du DNOC chez le lapin s'achève 3 à 4 jours après son administration par voie orale. Cependant 70 à 90 % de l'élimination se font pendant les premières 24 heures.

2) - Le DNOC est retrouvé dans l'urine sous forme de DNOC inchangé et sous forme d'amino-6-nitro-4-o-crésol et d'amino-4-nitro-6-o-crésol. La quantité totale excrétée exprimée en DNOC représente I3 à 38 % de la dose administrée.

3) - L'amino-4-nitro-6-o-crésol a toujours été trouvé en quantités très faibles dans les urines. Par contre les quantités d'amino-6-nitro-4-o-crésol sont très variables et semblent dépendre de l'importance de la dose administrée. Dans les urines émises pendant la phase aigüe de l'intoxication, la valeur du rapport amino-6-nitro-4-o-crésol / DNOC croît en fonction de la dose absorbée par l'animal.

La présence dans les urines, d'une grande quantité d'amino-6-nitro-4-o-crésol pourrait donc etre le signe d'une intoxication grave par le DNOC. D'ailleurs, dès I932, dans son étude sur le dinitrophénol GUERBET (47) avait déjà observé que l'apparition de l'amino-2-nitro-4-phénol dans les urines, coïncidait souvent avec les premiers symptômes de l'intoxication chez les ouvriers.

RELATIONS ENTRE LA CONCENTRATION SANGUINE DU DNOC ET LES QUANTITES ELIMINEES DANS L'URINE.

Nous avons vu que la concentration du DNOC dans le sang atteignait assez rapidement un palier qui se maintenait pendant environ six heures.

Pendant ce laps de temps, les quantités de DNOC et de ses métabolites excrétées, se stockent dans l'urine. En effet en analysant les urines émises entre I heure et 7 heures après l'administration, nous avons constaté que les quantités de DNOC et de ses métabolites augmentaient en fonction du temps (tableau n° 26).

Une heure après l'administration, l'animal a déjà excrété environ I % de la dose administrée.

Trois à quatre heures après 2 à 8 %
Cinq à sept heures après, environ 20 %

Après ce palier d'environ six heures, le taux de DNOC dans le sang commence à décroître et au bout d'une trentaine d'heures le DNOC n'est plus

TABLEAU N° 26

POURCENTAGES D'EXCRETION URINAIRE DU DNOC EN FONCTION DU TEMPS

Dose Administrée		Temps écoulé après l'administration	% I	% II
mg/kg	totale mg			
IO	48,6	Ih	I,6	6,I
I5	66	Ih 30	0,97	2,5
20	65,5	2h 30	2,I	-
I8	90	3h	2	-
5	I7,3	3h 30	4,3	33
IO	37	3h 45	8,7	-
IO	50	5 h	20,6	-
IO	27	6 h	I9,6	5I
I5	68	7 h	I9,5	73

I - % par rapport à la dose administrée

II - % par rapport à la dose excrétée

décelable, c'est-à-dire en tenant compte de la sensibilité de la méthode, que la concentration est devenue nulle ou inférieure à 2 µg/g.

Parallèlement dans l'urine, le pourcentage d'excrétion devient un peu moins important entre sept et vingt quatre heures après l'administration. Nous avons vu en effet que 50 à 70 % de l'excrétion s'effectuait dans les six ou sept premières heures, et 80 à 90 % au cours des premieres 24 heures. Les quantités excrétées entre sept et 24 heures représentent donc seulement IO à 40 % de l'excrétion totale.

A partir du deuxième jour les pourcentages d'excrétion deviennent très faibles.

Dans les expériences réalisées, l'élimination à partir du sang et l'excrétion urinaire, ont donc été en étroite corrélation.

TABLEAU N° 27

POURCENTAGES D'EXCRETION URINAIRE DU DNOC

7 et 24 heures après l'administration

Dose administrée		% d'excrétion 6-7 h. après l'administration		% d'excrétion 24 h. après l'administration	
mg/kg	totale	% I	% II	% I	% II
IO	27	I9,6	5I	37,4	96
I5	68	I9,5	73	25,9	97

I - par rapport à la dose administrée

II - par rapport à la dose totale excrétée

TABLEAU N° 28

COMPARAISON DES CONCENTRATIONS DU DNOC ET DES DERIVES AMINES

DANS LE SANG ET L'URINE

	Sang			Urine					
				DNOC		Amino-4-nitro-6-o-crésol		Amino-6-nitro-4-o-crésol	
Temps écoulé	DNOC µg/g	Dirivés aminés µg/g	Total µg	µg/ml	Total	µg/ml	Total	µg/ml
5 h	34	0	8566	I07	I55	2	I350	I6,8
3 h 45	23	0	I724	6	I39	0,48	II46	4
6 h	24	0						
24 h	8,3	0	9696	I24	6I6	7,8	5592	7I
48 h			742	I5,4	I58	3;2	594	I2,3
54 h	0	0						
3 jours			I42	I,2	0	0	0	0
5 h 30	27	0						
7 h			5040	II4	594	I3,5	6457	I46
24 h			4285	25	0	0	85	0,5
30 h	0	0						
36 h			326	2,4	0	0	5I	0,3
2 jours			I26	I,I	0	0	20	0,I
3 jours			44	0,3	0	0	0	0
2 h	50,5	0						
3 h			480	2,4	I8	0,09	II54	5,7

ELIMINATION PAR LES FECES.

Nous avons vu précèdemment que le pourcentage d'élimination du DNOC dans l'urine n'a jamais excèdé 60 % dans nos expériences. Par ailleurs nous avons également constaté qu'après cette élimination on ne trouvait plus de DNOC ou de nitro-amino-o-crésols dans les tissus. Nous avons donc envisagé l'hypothèse d'une excrétion de ces composés dans les fèces.

En même temps que nous suivions l'élimination urinaire du DNOC chez un lapin qui avait reçu 5 mg/kg, nous avons également analysé les fèces.

L'animal avait été placé dans sa cage la veille de l'administration, de telle sorte qu'un prélèvement de fèces témoin a pu être fait avant le sondage.

Les autres prélèvements ont été effectués après le traitement :

au jour I
au jour 2] réunis
au jour 3]

En aucun cas, le DNOC et les nitro-amino-o-crésols n'ont été identifiés.

ETUDE DES CONCENTRATIONS DU DNOC ET DE SES METABOLITES DANS LES ORGANES.

T R A V A U X A N T E R I E U R S

En I95I PARKER (79) avait étudié la répartition du DNOC dans les tissus chez le rat, après des injections sous-cutanées de I0 mg/kg. Il avait également suivi l'évolution de ces concentrations au cours du temps 30 mn, I, 2, 3, 4, 5 et 6 heures après l'administration. Il a ainsi pu observer que dans tous les tissus analysés (sérum, cerveau, rate, reins, foie, coeur, poumons) le taux du DNOC commençait à décroître 3 à 4 heures après l'administration.

En I963, E.N.BURKATSKAYA (I6) a complété cette étude en suivant chez le rat et chez le chat, l'évolution des concentrations de différents nitro-phénols dans les tissus après administration par voie orale de doses variant de I0 à I00 mg/kg.

Il a observé que les vitesses de disparition de ces composés dans les organes étaient les suivants :

- dinitrophénol	24 heures
- dinitro-o-crésol	3 jours
- dinitro-sec butyl-phénol	5 jours
- dinitro-o-propyl-phénol	I0 jours

BREINLICH(I7) en I956 au cours d'une expertise toxicologique consécutive à un empoisonnement par le DNOC, avait recherché les amino-nitro-o-crésols dans les viscères. Mais aucun auteur n'avait encore entrepris d'expérimentation sur les animaux de laboratoire pour mettre en évidence la présence éventuelle et la répartition du DNOC et de ses métabolites dans les différents organes. C'est donc dans ce sens là que nous avons orienté notre travail.

ETUDE DES CONCENTRATIONS DU DNOC ET DE SES METABOLITES DANS LES ORGANES CHEZ LE LAPIN.

E X P E R I M E N T A T I O N P E R S O N N E L L E

I°) - Méthode

a) - Administration du DNOC.

Comme pour l'excrétion urinaire, nous avons utilisé le sondage stomacal après un jeûne de quinze heures. Le DNOC avait été préalablement mis en solution dans de l'eau alcalinisée selon KING et HARVEY (57 - 58).

b) - Prélèvements.

Les animaux qui n'avaient pas reçu de dose mortelle ont été sacrifiés 3 ou 5 heures après le sondage. Les autres ont succombé, mortellement intoxiqués, 3 h ou 3 h 45 après l'administration.

Dans tous les cas, les différents organes ont été prélevés immédiatement après la mort.

c) - Technique analytique.

Nous avons appliqué la méthode que nous avions mise au point et que nous avions décrite p. 96 .

L'extraction acétonique a été effectuée le plus tôt possible le jour même de la mort, ou le lendemain après conservation au réfrigérateur.

2°) - Résultats.

Quatre lapins mâles ont reçu de IO à 20 mg/kg de DNOC. Quand ils n'étaient pas intoxiqués mortellement, ils étaient sacrifiés 3 à 5 heures après l'administration.

TABLEAU N° 29

	Dose de DNOC		Temps écoulé entre l'administration et la mort
	mg/kg	Totale en mg	
Lapin I	IO	37	3h 45
Lapin II	IO	50	5h
Lapin III	I8	90	3h
Lapin IV	20	65,5	3h 45

Les tableaux N° 30 à 34 indiquent les concentrations du DNOC et de ses métabolites dans les différents organes.

a) - Nature des Composés identifiés.

Le DNOC a été identifié dans presque tous les organes analysés, quelle que soit la dose administrée, et l'amino-6-nitro-4-o-crésol a été trouvé dans certains organes et pour certaines doses seulement.

En aucun cas l'amino-4-nitro-6-o-crésol n'a été identifié.

b) - Concentrations de ces composés dans les différents organes.

Dans les Reins.

- Le DNOC: pour les quatre lapins, les concentrations du DNOC dans les reins n'ont pas montré de grandes variations.

TABLEAU N° 30

Dose de DNOC administrée en mg/kg	Temps écoulé	Dose de DNOC administrée en mg/kg	DNOC µg/g dans les reins	Amino-6-nitro-4-o-crésol dans les reins µg/g
I0	3h 45	I0	I,6	0,68
I0	5h	I0	3,9	I,4
I8	3h	I8	3,8	I8,I
20	3h 45	20	2,4	I2,7

- L'amino-6-nitro-4-o-crésol. Contrairement à ce que nous avons observé pour le DNOC, nous notons avec l'amino-6-nitro-4-o-crésol des variations importantes dans les concentrations suivant la dose de DNOC administrée

De 0,68 à I,4 µg/g pour une dose de IO mg/kg, les concentrations passent à I8,I et I2,7 µg/g pour des doses de I8 et 20 mg/kg.

Dans le foie.

- Les concentrations de DNOC sont plus faibles que dans les reins.

TABLEAU N° 3I

Dose de DNOC administrée mg/kg	DNOC µg/g dans le foie	Amino-6-nitro-4-o-crésol mg/g dans le foie
IO	0,I7	0
IO	0,29	0
I8	I,4	0,67
20	0,49	0,39

L'amino-6-nitro-4-o-crésol n'a été identifié que dans le cas des intoxications mortelles et en bien plus faible quantité que dans les reins.

Dans l'encéphale.

Les concentrations du DNOC et de l'amino-6-nitro-4-o-crésol sont un peu plus importantes que dans le foie, mais moindres que dans les reins.

TABLEAU N° 32

Dose de DNOC administrée mg/kg	DNOC dans l'encéphale µg/g	Amino-6-nitro-4-o-crésol dans l'encéphale µg/g
IO	0,58	0
IO	0,34	0
I8	I,95	I,03
20	I,4	0,42

Dans_les_poumons.

Chez un lapin qui avait reçu IO mg/kg de DNOC nous avons trouvé 4,3 µg/g de DNOC et I,3 µg/g d'amino-6-nitro-4-o-crésol.

Dans_les_Gonades.

Après l'administration de IO mg/kg, les gonades contenaient I,6 µg/g de DNOC mais l'amino-6-nitro-4-o-crésol n'a pas été identifié.

Dans_les_Glandes_surrénales.

Les glandes surrénales ont été analysées chez deux lapins qui avaient reçu respectivement IO mg/kg et 20 mg/kg de DNOC.

Ni le DNOC ni l'amino-6-nitro-4-o-crésol n'y ont été identifiés, mais il est possible que les quantités présentes aient été trop faibles pour être détectées.

Dans la Moelle osseuse.

Les concentrations en DNOC sont les plus élevées que nous ayons déterminées dans les tissus, après celles du sang. Après administration de IO mg/kg, il y en avait 2,I µg/g, et après 20 mg/kg 7,4 µg/g.

Mais dans aucun cas nous n'avons trouvé de l'amino-6-nitro-4-o-crésol.

Dans la graisse.

Un peu de DNOC se localise dans les graisses abdominales.

TABLEAU N° 33

DNOC administré mg/kg	DNOC dans les graisses µg/g
IO	0,73
IO	0,88
20	I,6

Notons qu'il ne doit s'agir ici que d'une localisation momentanée car chez les animaux sacrifiés huit jours après administration de IO mg/kg, il n'a pas été retrouvé de DNOC dans les graisses.

QUANTITES TOTALES ET CONCENTRATIONS DU DNOC ET DE L'AMINO-6-NITRO-4-O-CRESOL DANS LES ORGANES CHEZ LE LAPIN

Organes	Lapin I 10 mg/kg				Lapin II 10 mg/kg				Lapin III 18 mg/kg				Lapin IV 20 mg/kg			
	DNOC		Amino-6-nitro-4-o-crésol		DNOC		Amino-6-nitro-4-o-crésol		DNOC		Amino-6-nitro-4-o-crésol		DNOC		Amino-6-nitro-4-o-crésol	
	Total mg	µg/g	Total mg	µg/g	Total mg	µg/g	Total mg	µg/g	Total mg	µg/g	Total mg	µg/g	Total mg	µg/g	Total mg	µg/g
Sang		23		0		34		0		50(a)		0				
Poumons	52,4	4,3	I6,7	I,3												
Reins	37,5	I,6	I5,9	0,68	80,6	3,9	30	I,4	93,5	3,8	444	I8,I	6I	2,4	323	I2,7
Moelle osseuse		2,I		0										7,4		0
Gonades	20,I	I,6	0	0												
Graisse		0,73		0		0,88		0						I,6		0
Encéphale	5,7	0,58	0	0	3	0,34	0	0	20,7	I,9	II	I,03	I4,2	I,4	4	0,42
Foie	I4,5	0,I7	0	0	30,5	0,29	0	0	I70	I,4	78	0,67	44	0,49	35	0,39
Surrénales	0	0	0	0									0	0	0	0

(a) - prise de sang effectuée une heure avant la mort.

3°) - Conclusions.

a) - Si l'on considère les concentrations totales du DNOC et de l'amino-6-nitro-4-o-crésol dans les différents tissus, on constate que leur ordre de classement est sensiblement le même pour les quatre lapins quelle que soit la dose administrée.

TABLEAU N° 35

Organes	Concentrations en µg/g du DNOC et de l'amino-6-nitro-4-o-crésol (exprimé en quantités équivalentes de DNOC)			
	Lapin I (10 mg/kg)	Lapin II (10 mg/kg)	Lapin III (18 mg/kg)	Lapin IV (20 mg/kg)
Sang	23	34	50 (a)	
Poumons	5,8			
Reins	2,4	5,5	25,1	27,6
Moelle osseuse	2,1			7,4
Gonades	1,6			
Graisses	0,73	0,88		1,6
Encéphale	0,58	0,34	3,1	2,8
Foie	0,17	0,29	2,1	0,94

(a) - prise de sang effectuée 1 heure avant la mort.

b) - On peut également observer que lorsque la dose administrée est doublée, les concentrations totales des 2 composés, dans les reins, le foie et l'encéphale sont au moins quintuplées. Cette différence est dûe essentiellement à la présence de l'amino-6-nitro-4-o-crésol. Dans les tissus où l'amino-6-nitro-4-o-crésol n'a jamais été identifié (sang, moelle osseuse, graisse) les concentrations en DNOC sont sensiblement doublées quand la dose administrée est multipliée par deux.

c) - Le rapport des concentrations d'amino-6-nitro-4-o-crésol et de DNOC dans les organes varie considérablement avec la dose administrée. Le tableau n°36 montre que lorsque l'intoxication est faible (IO mg/kg) la valeur de ce rapport est beaucoup moins élevée que lorsque l'intoxication est mortelle (I8 à 20 mg/kg). C'est dans les reins que ce rapport est le plus élevé.

TABLEAU N° 36

Référence des lapins	DNOC administré mg/kg	DNOC administré Total	Temps écoulé après administration	Rapport amino-6-nitro-4-o-crésol / DNOC — Reins	Foie	Cerveau
I	IO	37	3h 45	0,68/I,6 = 0,42	0/0,I7 = 0	0/0,58 = 0
II	IO	50	5h	I,4 /3,9 = 0,35	0/0,29 = 0	0/0,34 = 0
III	I8	90	3h	I8,I/3,8 = 4,76	0,67/I,4 = 0,47	I,03/I,95 = 0,52
IV	20	65,5	3h 45	I2,7/2,4 = 5,29	0,39/0,49 = 0,79	0,42/I,4 = 0,30

La détermination de l'amino-6-nitro-4-o-crésol dans les tissus et spécialement dans les reins est donc très importante, car il semble bien que le rapport ANOC / DNOC puisse être considéré comme un réel indicateur de la gravité d'une intoxication.

TRANSFORMATIONS DU DNOC ET DE SES METABOLITES AU COURS DE LA PUTREFACTION.

L'étude des transformations possibles du DNOC et de ses métabolites dans les tissus post-mortem, était nécessaire à l'interprétation correcte des résultats des analyses.

En effet, il était indispensable de fixer les conditions dans lesquelles les échantillons de tissus prélevés après la mort, pouvaient être conservés sans que le DNOC ou ses métabolites amorcent une dégradation. D'après BUZZO, il y aurait réduction des deux groupements NO_2 lors de la putréfaction. (I7)

D'autre part nous avons vu que le rapport amino-6-nitro-4-o-crésol / DNOC était très important pour l'évaluation de l'intensité d'une intoxication. Il était intéressant de voir si la valeur de ce rapport ne pouvait pas être modifiée lorsque l'analyse n'était pratiquée que plusieurs jours ou plusieurs semaines après la mort, comme cela peut se produire à la suite d'accidents.

Nous avons donc suivi l'évolution dans le sang et l'urine, des concentrations du DNOC et des amino-nitro-o-crésols au cours du temps, dans différentes conditions de stockage.

I°) - Evolution du DNOC et de ses métabolites dans le sang.

Nous avons étudié l'influence du temps et de la température sur la conservation des échantillons.

a) - Conservation à 20°C.

L'expérience a été faite sur le sang d'un lapin qui avait reçu IO mg/kg de DNOC.

TABLEAU N° 37

Composés	Concentrations en µg/g		% de perte
	Jour 0	Jour 55	
DNOC	23	0	IOO
Amino-4-nitro-6-o-crésol	0	0	
Amino-6-nitro-4-o-crésol	0	0	

Le DNOC a disparu complètement au bout de 55 jours, mais il n'est pas apparu d'amino-nitro-o-crésols pour autant.

b) - Conservation au réfrigérateur vers 0°.

Conservation I5 jours. - L'expérience a été réalisée avec le sang d'un lapin qui avait reçu IO mg/kg de DNOC.

TABLEAU N° 38

Composés	Concentrations en µg/g		% de perte
	Jour 0	Jour I5	
DNOC	34,I	3I,8	6,7
Amino-4-nitro-6-o-crésol	0	0	
Amino-6-nitro-4-o-crésol		0,2	

La concentration en DNOC a baissé de 6 %, ce qui ne peut être considéré comme significatif étant donné la précision de la méthode d'analyse. L'amino-6-nitro-4-o-crésol apparu en très petite quantité représente environ 0,6 % du DNOC initial.

Conservation 55 jours. - L'expérience a été effectuée sur le sang d'un lapin qui avait reçu IO mg/kg de DNOC. On a observé une disparition de I8 % du DNOC, tandis que l'amino-6-nitro-4-o-crésol apparu en très faible quantité ne représente que 3,5 % du DNOC initial.

TABLEAU N° 39

Composés	Concentrations en µg/g		% de perte
	Jour 0	Jour I5	
DNOC	23	I8,7	I8
Amino-4-nitro-6-o-crésol	0	0	
Amino-6-nitro-4-o-crésol	0	0,7	

En conclusion, lorsque le sang est conservé à la température du laboratoire, il y a dégradation totale du DNOC sans qu'il y ait apparition d'amino-nitro-o-crésols, ou peut être celle-ci n'est-elle que transitoire.

Placés au réfrigérateur aux alentours de 0°, les échantillons peuvent être conservés une quinzaine de jours, sans qu'il y ait de transformations importantes.

2°) - Evolution du DNOC et de ses 2 metabolites dans l'urine.

Nous avons comparé l'évolution des concentrations de ces trois composés dans les urines conservées dans les conditions suivantes :

- A 20° C.

  - sans acidification
  - avec acidification préalable par l'acide chlorhydrique

- Au voisinage de 0° C.

  - sans acidification
  - avec acidification préalable par l'acide chlorhydrique.

a) - Conservation à 20° C.

A 2 prélèvements d'urine émise par un lapin n'ayant pas reçu de DNOC, nous avons ajouté 2500 µg de DNOC. L'un a été conservé tel quel, pendant 3 semaines à 20°C, l'autre a été rendu acide 2 N par l'acide chlorhydrique et conservé également 3 semaines à 20°C. Au bout de ce laps de temps le DNOC avait été transformé de la façon suivante :

TABLEAU N° 40

	DNOC ajouté	DNOC retrouvé		Amino-6-nitro-4-o-crésol apparu	
	en µg	en µg	%	en µg	%
Urine non acidifiée	2500	0	0	244	II
Urine acidifiée	2500	I750	70	I40	6

Lorsque l'urine est conservée sans acidification, il y a disparition totale du DNOC en 3 semaines. Il ne se transforme en amino-6-nitro-4-o-crésol que dans la proportion de II %.

En milieu acide 70 % du DNOC a été retrouvé sous sa forme primitive, et 6 % sous forme d'amino-6-nitro-4-o-crésol.

b) - Conservation au voisinage de 0° C.

Sans acidification. - L'urine d'un lapin qui avait reçu I0 mg/kg de DNOC a été analysée au jour 0, puis I5 jours plus tard. L'évolution des concentrations a été la suivante :

TABLEAU N° 4I

DNOC en µg/ml			Amino-4-nitro-6-o-crésol en µg/ml			Amino-6-nitro-4-o-crésol en µg/ml		
ur 0	Jour I4	% de perte	Jour 0	Jour I4	% de gain	Jour 0	Jour I4	% de gain
I07	75	- 30	I,9	5,3	+ I78	I6,8	26,4	+ 57

Le DNOC a donc diminué de 30 % tandis que l'amino-4-nitro-6-o-crésol a augmenté de I78 % et l'amino-6-nitro-4-crésol de 57 %

Si l'on exprime les concentrations d'amino-nitro-o-crésols en quantités équivalentes de DNOC, on constate que les 30 % de perte du DNOC se répartissent en I4 % d'amino-nitro-o-crésols
en I6 % de produits de dégradation inconnus

Avec acidification préalable. - L'expérience a été effectuée sur l'urine d'un lapin qui avait reçu IO mg/kg de DNOC. Au bout d'un mois de conservation, il n'y a pas eu de modifications significatives des concentrations, compte tenu de la précision de la méthode.

TABLEAU N° 42

DNOC en µg/g			Amino-4-nitro-6-o-crésol en µg/g			Amino-6-nitro-4-o-crésol en µg/g		
our 0	Jour 30	% de gain	Jour 0	Jour 30	% de perte	Jour 0	Jour 30	% de perte
8,8	9,4	+ 6	2,4	2,2	- 8	I3	I2,I	- 6

3°) - Conclusions.

De cette étude il ressort les faits suivants :

a) - Les analyses doivent être pratiquées le plus rapidement possible après la mort. Toutefois les échantillons de sang peuvent être conservés sans al-

tération au réfrigérateur vers 0°C pendant une quinzaine de jours.

Les échantillons d'urine peuvent être conservés pendant au moins un mois au réfrigérateur vers 0°C, à condition de les acidifier fortement.

b) - Dans les urines prélevées sur des cadavres putréfiés, le rapport amino-6nitro-4-o-crésol / DNOC ne pourra plus être pris comme indicateur de l'intensité d'une intoxication, une partie du DNOC se dégradant en amino-6-nitro-4-o-crésol au cours de la putréfaction.

CONCLUSIONS.

Lors des intoxications expérimentales par le DNOC chez le lapin nous avons observé les faits suivants :

I°) - Trente à cinquante heures après l'administration par voie orale, le DNOC n'est plus décelable dans le sang. Pendant la phase aigüe de l'intoxication, la concentration du DNOC atteint rapidement un maximum et s'y maintient pendant 4 à 5 heures. Aucun des amino-nitro-o-crésols n'a pu être identifié dans le sang.

2°) - L'élimination urinaire du DNOC se fait sous forme de DNOC inchangé, d'amino-4-nitro-6-o-crésol et d'amino-6-nitro-4-o-crésol. Elle se poursuit pendant 3 à 4 jours, mais la majeure partie s'effectue dans les premières 24 heures après l'administration. Durant la phase aigüe de l'intoxication, le rapport amino-6-nitro-4-o-crésol / DNOC présents dans l'urine, dépend de l'intensité de l'intoxication. Plus l'intoxication est forte, plus la valeur de ce rapport est élevée.

3°) - Dans les organes également, le rapport ANOC / DNOC dépend de l'intensité de l'intoxication. Lors des intoxications mortelles, la valeur de ce rapport est nettement plus élevée, spécialement dans les reins.

4°) - Le dosage des dérivés aminés dans l'urine et dans les organes est donc très important lors des analyses consécutives à un empoisonnement par le DNOC. Mais il est nécessaire que ces déterminations soient effectuées sur des prélèvements récents, ou sur des échantillons conservés dans les conditions que nous avons décrites précèdemment.

QUATRIEME PARTIE

ETUDES DE TOXICOLOGIE AGRONOMIOUE RELATIVES A CERTAINES APPLICATIONS DU DNOC EN AGRICULTURE

Des mortalités importantes de lièvres avaient été signalées en 1964 à la suite de traitements de céréales par le DNOC. Les véritables causes de ces accidents n'ont pu être élucidées immédiatement, car il y avait trop d'inconnues. Une expérimentation s'imposait pour essayer de définir les conditions dans lesquelles de telles mortalités pouvaient se produire.

Deux groupes de déterminations ont été entrepris en collaboration avec MM. GIBAN et GROLLEAU du Laboratoire des Petits Vertébrés de l'I.N.R.A.

Premier groupe.

Détermination des résidus de DNOC sur blé lors des traitements de plein champ, en rapport avec les risques d'intoxication pour les lièvres. Comparaison des résultats en fonction des différents types de traitement utilisés.

Deuxième groupe.

Détermination en enclos, du taux de résidus à partir duquel les lièvres sont exposés à des risques certains d'intoxication.

L'analyse des animaux morts intoxiqués était prévue afin de comparer les différentes concentrations de DNOC dans les organes, chez le lapin et chez le lièvre.

DETERMINATION DES RESIDUS DE DNOC LAISSES SUR BLE PAR LES TRAITEMENTS

A la suite des importantes mortalités provoquées en 1964 chez les lièvres par des traitements aériens de céréales au DNOC, une hypothèse fut émise pour expliquer cet accident.

Pour une même dose de matière active épandue à l'hectare, un traitement aérien effectué avec un faible volume de liquide ne risquait-il pas de laisser sur les blés, des résidus plus importants que les traitements classiques nécessitant un volume 15 à 20 fois plus important.

On pouvait en effet supposer que dans le premier cas, le ruissellement de la pulvérisation sur les feuilles étant considérablement réduit, l'importance du dépôt de matière active sur les blés pourrait s'en trouver augmentée. Par conséquent la consommation de ces blés par les lièvres risquait d'être plus dangereuse que lors des traitements à grand volume.

C'est cette hypothèse que nous avons entrepris de vérifier en comparant l'importance et la persistance des résidus de DNOC laissés par les pulvérisations aériennes à forte concentration et les pulvérisations par appareil au sol, à faible concentration.

METHODE

I°) - Conditions des traitements.

Tous les traitements ont été effectués à la même dose de matière active de 5 kg/ha de dinitro-o-crésolate d'ammonium.

Trois sortes de pulvérisations ont été faites.

a) - Traitement par hélicoptère BELL.

Avec un volume de 45 litres à l'hectare et sur blé peu développé, offrant par conséquent une surface de réception assez réduite.

b) - Traitement par hélicoptère DJINN.

Avec un volume de 30 litres à l'hectare et sur un blé environ deux fois plus développé que dans le cas précédent.

c) - Traitement avec un appareil au sol.

Avec un volume de 500 litres à l'hectare et sur un blé environ trois fois plus développé que dans le premier cas.

2°) - Conditions des prélèvements.

Des échantillons de 10 à 20 g de blé ont été prélevés et placés dans de petits sacs de matière plastique, pour éviter toute perte de matière active au cours du transport et du stockage.

Trois séries de prélèvements ont été effectués pour chaque type de traitement :

- au jour 0
- au jour 3 ou 4
- au jour 7

TABLEAU N° 43

Nature des traitements	Nombre d'hectares traités	Nombre de prélèvements de blé		
		Jour 0	Jour 3 ou 4	Jour 7
Hélicoptère BELL	36	50	50	IO
Hélicoptère DJINN	40	50	50	50
Appareil au sol	2	50	50	IO

Dans le cas des traitements par hélicoptère sur une grande surface, nous avons délimité IO carrés d'un hectare en différents points de la surface traitée. A l'intérieur de chacun de ces carrés 5 prélèvements ont été effectués régulièrement.

Dans le cas du traitement à grand volume, les prélèvements ont été effectués en des points équidistants sur toute la surface du champ.

3°) - Méthode analytique.

Nous avons appliqué la méthode de dosage que nous avions mise au point et que nous avons décrite p. 98 .

RESULTATS.

I°) - Taux des résidus de DNOC immédiatement après le traitement.

La moyenne générale des résultats et leur répartition ont été les suivants :

a) - Traitement par hélicoptère BELL.

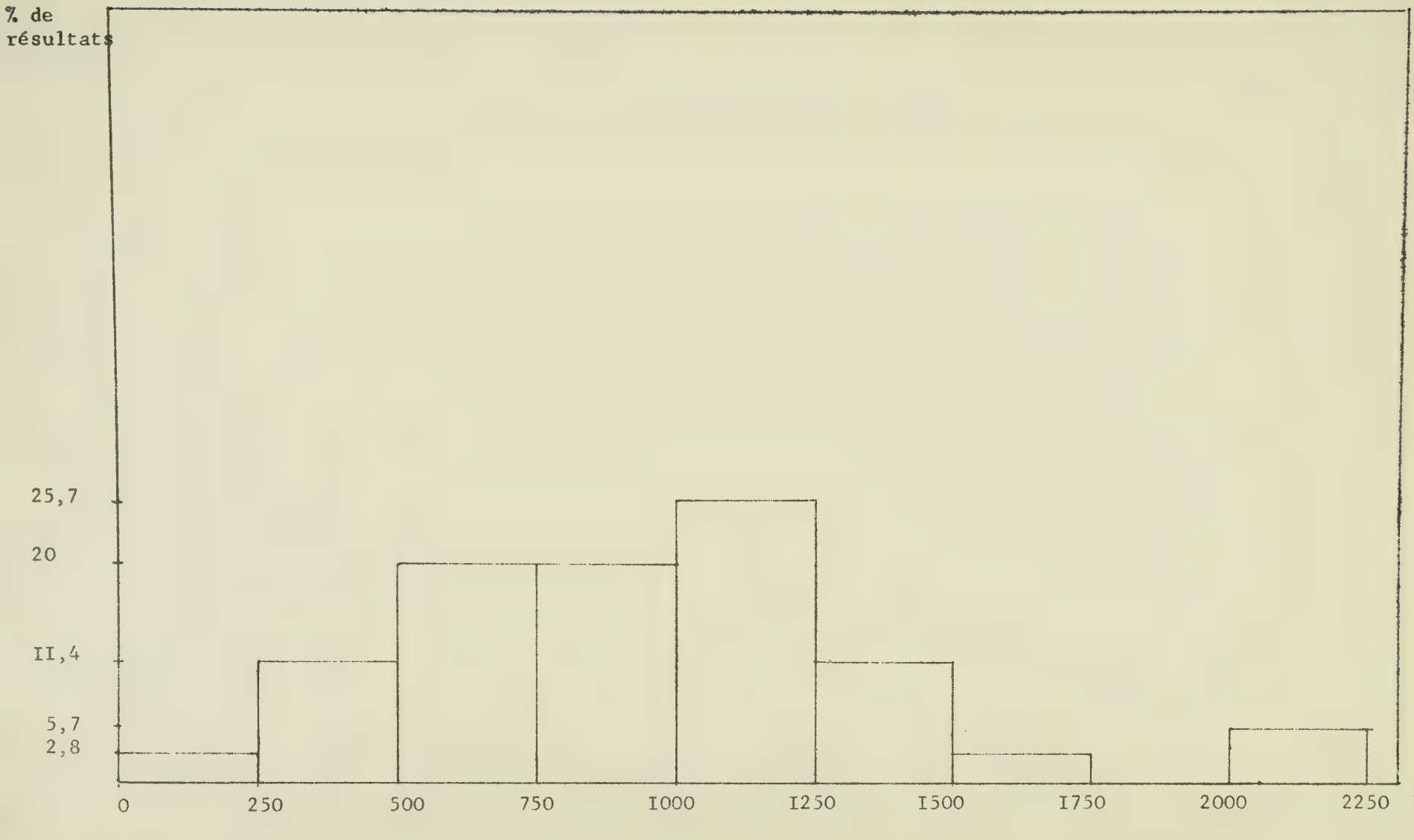
Moyenne générale	964 ppm		
Répartition :	I96	à 500 ppm	I4 %
	500	à I000 ppm	40 %
	I000	à I500 ppm	37 %
	I500	à 2225 ppm	9 %

b) - Traitement par hélicoptère DJINN.

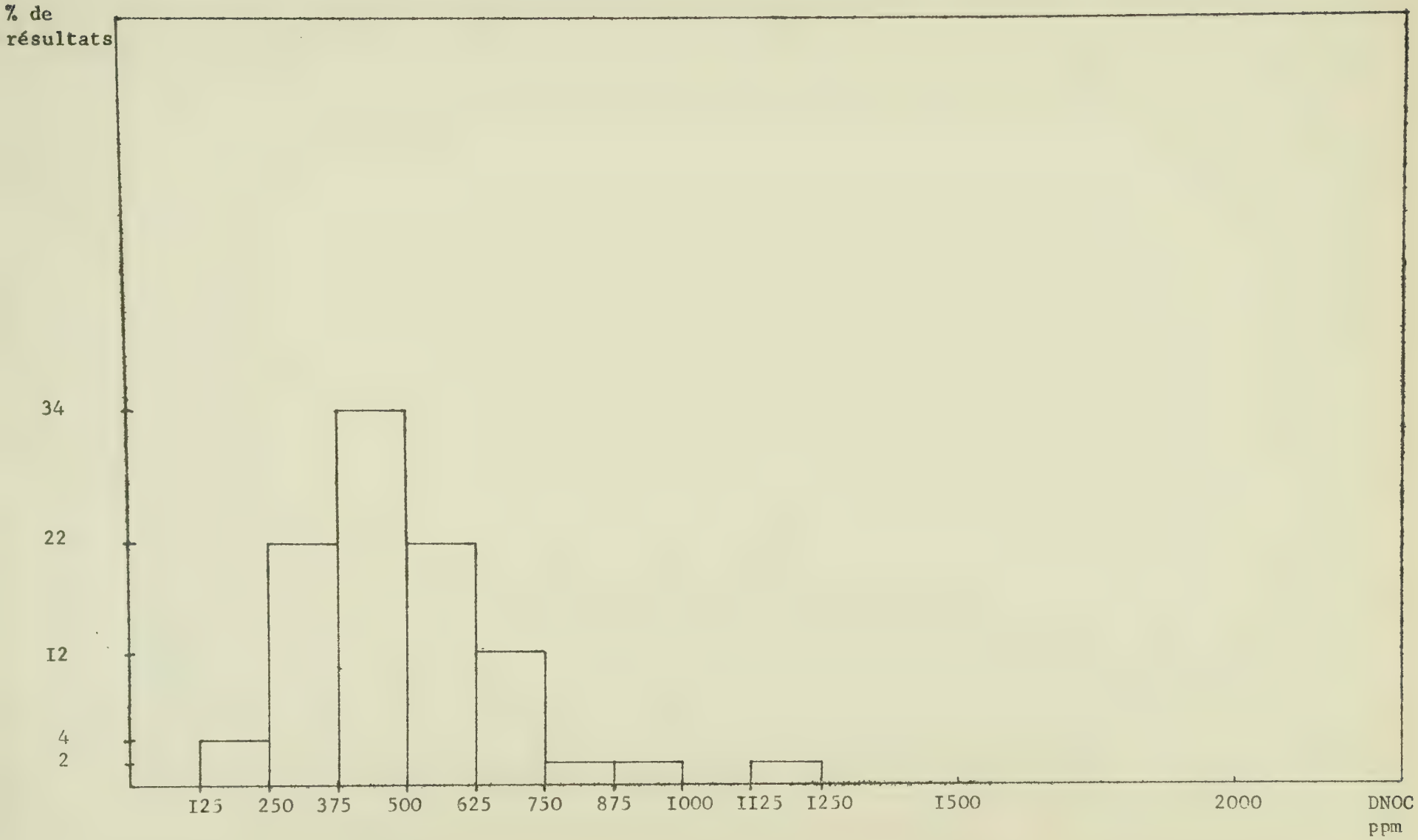
Moyenne générale	485 ppm		
Répartition :	230	à 375 ppm	26 %
	375	à 500 ppm	34 %
	500	à 750 ppm	34 %
	750	à I000 ppm	4 %
	I000	à I230 ppm	2 %

c) - Traitement par appareil au sol.

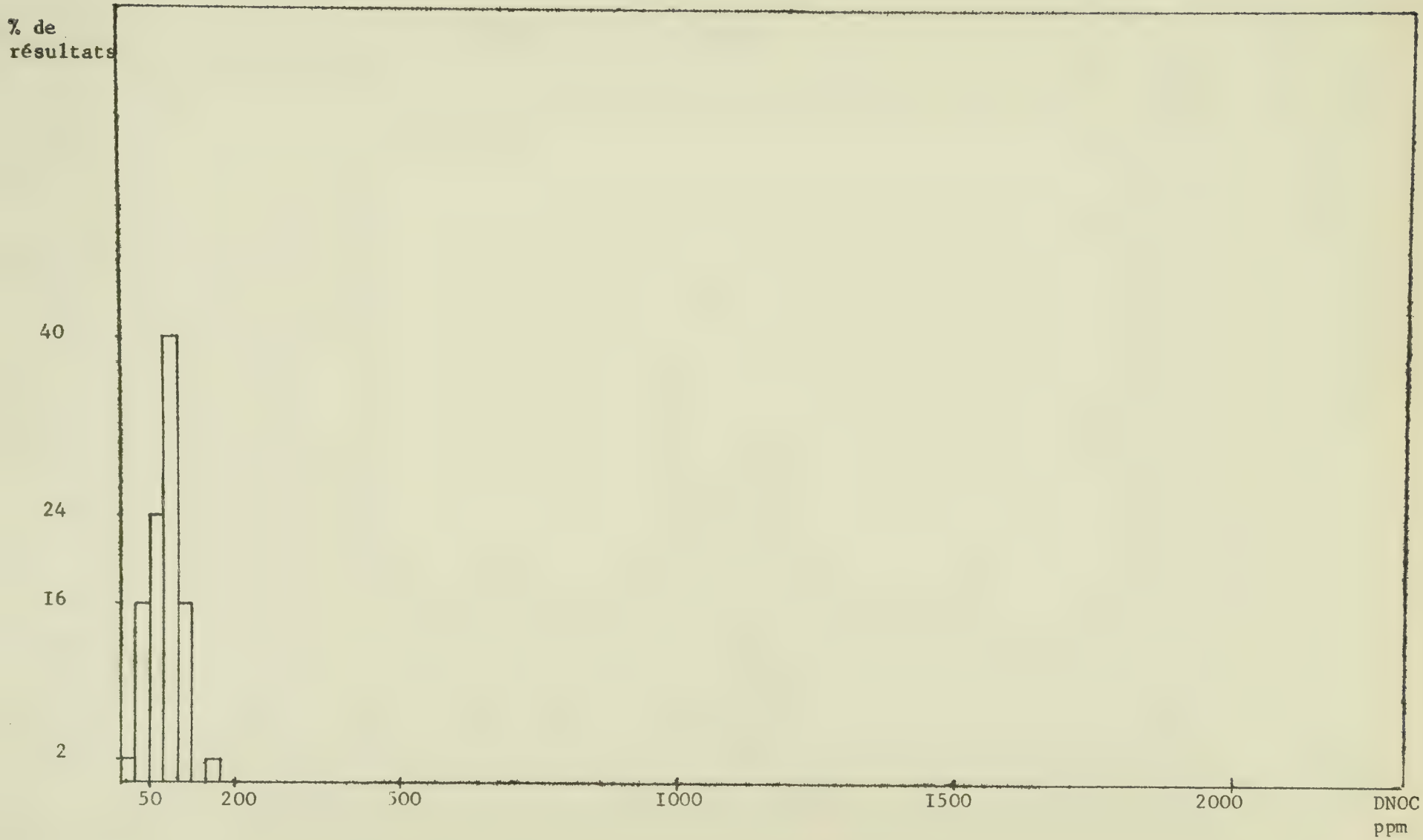
Moyenne générale	78 ppm		
Répartition :	I9,5	à 50 ppm	I8 %
	50	à I00 ppm	64 %
	I00	à I7I ppm	I8 %


% de résultats
25,7
20
II,4
5,7
2,8
0
250
500
750
I000
I250
I500
I750
2000
2250
DNOC ppm

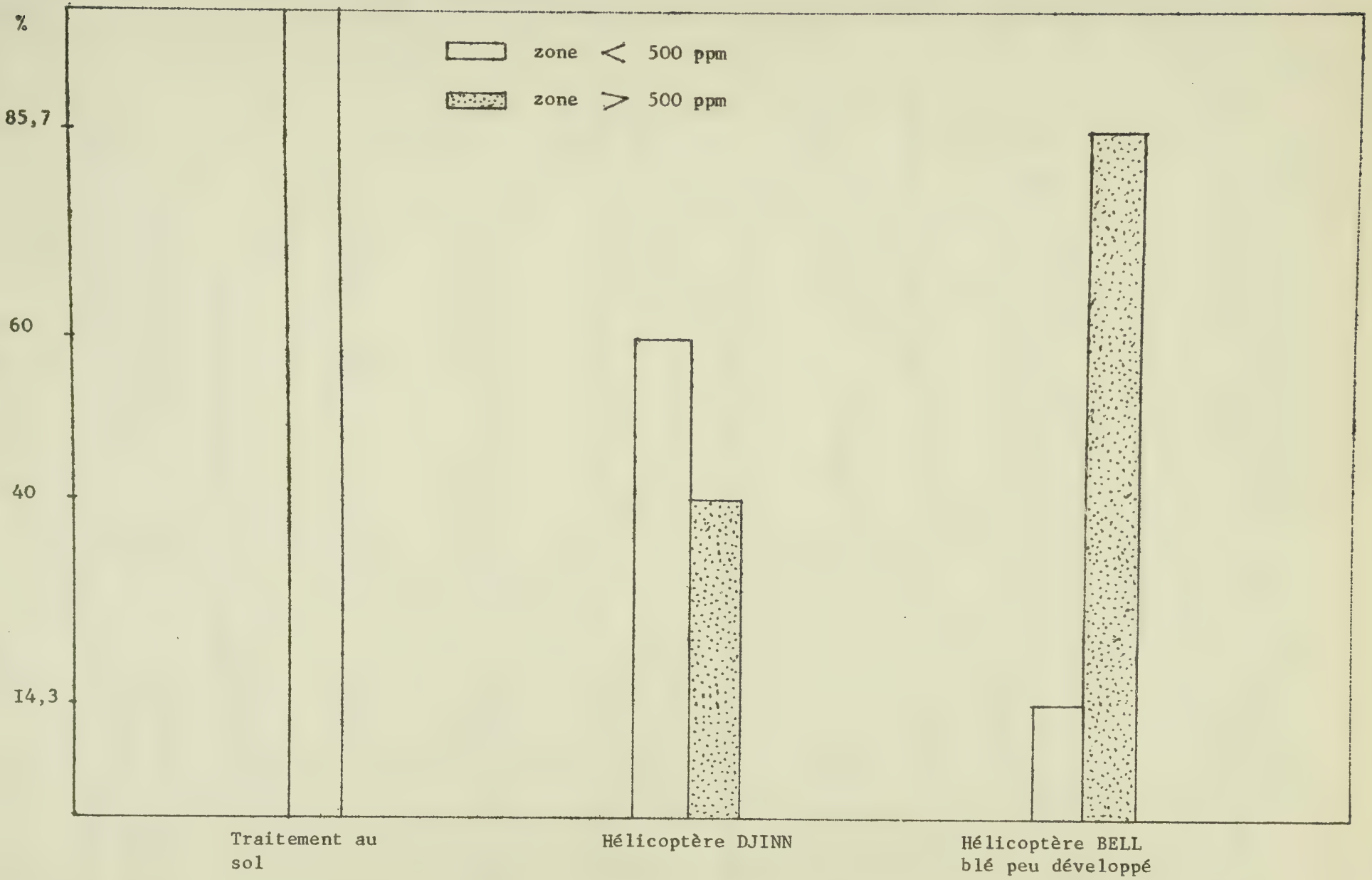
avec 5 kg/ha de dinitrocrésolate d'ammonium dans 30 litres - Hauteur de blé 8 à 10 cm.



dinitrocrésolate d'ammonium dans 500 litres - Hauteur du blé IO à I5 cm.



de 500 ppm.


%
85,7
60
40
I4,3
zone < 500 ppm
zone > 500 ppm
Traitement au sol
Hélicoptère DJINN
Hélicoptère BELL
blé peu développé

C'est le traitement par hélicoptère avec 45 litres/hectare sur blé peu développé qui a laissé les résidus les plus importants.

2°) - Effets sur les animaux sauvages.

Aucun cadavre n'a été trouvé dans les champs traités par hélicoptère BELL où les résidus atteignaient 964 ppm, mais il faut préciser qu'une forte pluie d'orage s'est abattue juste après le traitement.

Un pigeon et une alouette ont été trouvés morts après le traitement par hélicoptère DJINN.

Dans le cas du traitement à grand volume aucun cadavre n'a été trouvé.

3°) - Evaluation des risques d'intoxication pour les lièvres.

D'après les expériences de toxicité sur lièvres que nous décrirons plus loin (Voir p. I63) il semble que l'on puisse situer le taux de résidus de DNOC présentant un danger certain pour les lièvres vers 500 à 600 ppm.

Or dans les trois types de traitement, les pourcentages d'échantillons de blé présentant des résidus supérieurs à 500 ppm ont été les suivants :

Hélicoptère BELL	85,7 %
Hélicoptère DJINN	40 %
Appareil au sol	0 %

4°) - Importance du stade de développement du blé.

Les deux traitements à bas volume ont été effectués, l'un sur un blé très peu développé (3 à 5 cm), l'autre sur un blé beaucoup plus développé (8 à I0 cm). Pour la même surface de champ traitée, il y a donc des poids

de blé différents, donc des taux de résidus différents. Il est donc très possible que la différence de taux des résidus trouvée entre ces deux traitement (964 et 485 ppm) soit due, tout au moins partiellement, à la différence de stade de développement du blé.

5°) - Evolution des résidus.

Les résidus ont été dosés au jour 3 ou 4 et au jour 7, pour chaque série de traitement. Les résultats ont été comparés aux résidus du jour 0 (voir tableau n° 44).

La première observation est que les résidus de dinitro-o-crésolate d'ammonium sont très facilement entraînables par la pluie, quel que soit le mode de traitement.

En l'espace d'une heure, avec une pluie orageuse de 0,6 mm, les résidus sont passés de 1291 à 199 ppm ; c'est-à-dire que 85 % ont été entraînés par la pluie.

D'autre part, avec une pluviosité presque nulle ($< 0,2$ mm) il n'est plus resté au jour 4 que 23 % du taux initial de résidus.

En fait dans les trois types de traitement, les résidus ont diminué d'au moins 96 % en une semaine, avec une pluviosité variant de 4 à 13 mm.

CONCLUSIONS.

1) - Dans les essais réalisés, les traitements à bas volume ont laissé des résidus de DNOC beaucoup plus importants que les traitements à grand volume.

2) - Dans les traitements à bas volume, les taux de résidus ont dépassé le seuil dangereux pour les lièvres, de 500 ppm. Dans le traitement au sol, les résidus sont restés bien inférieurs à ce seuil.

IMPORTANCE ET EVOLUTION DES RESIDUS DE DNOC SUR BLE, A LA SUITE DE TRAITEMENTS EFFECTUES AVEC LA MEME DOSE DE MATIERE ACTIVE, MAIS AVEC DES VOLUMES DE PULVERISATION DIFFERENTS.

Nature des Traitements		Jour 0				Jour 3 ou 4				Jour 7			
		Pluie mm	Nbre échant. analysés	DNOC ppm	% résidus ayant persisté	Pluie mm	Nbre échant analysés	DNOC ppm	%résidus ayant persisté	Pluie mm	Nbre échant analysés	DNOC ppm	% résidus ayant persisté
HELICOPTERE BELL avec 45 l/ha	I		25	833		I2,6	25	6,2	0,7	0,6	5	0,8	0,09
	II_A		I0	I29I		I2,6	I0	4,9	0,3	0,6	2	0,9	0,06
	II_B	0,6	I5	I99	I5,4	I2	I5	3,7	I,8	0,6	3	2	I
HELICOPTERE DJINN avec 30 l/ha			50	485		<0,2	50	II6	23,9	4	50	I7,2	3,5
APPAREIL AU SOL avec 500 l/ha			50	78		7	50	I,5	I,9	3,5	I0	0,4	0,5

3) - Les traitements précoces sur blé peu développé, laissent des résidus plus importants, et présentent par conséquent plus de risques.

4) - Le taux des résidus diminue très rapidement au cours du temps, même sans pluviosité importante. On peut dire que les risques d'intoxication pour les lièvres disparaissent complètement au plus tard, au jour 4 après le traitement. En cas de pluie orageuse ils peuvent être supprimés en l'espace d'une heure.

DOSAGE DU DNOC ET DE SES METABOLITES DANS LES LIEVRES INTOXIQUES EXPERIMENTALEMENT

Des expériences ont été réalisées en collaboration avec MM. GIBAN et GROLLEAU dans le but de déterminer le taux de résidus de DNOC sur blé, présentant un danger certain pour les lièvres qui consommeraient cette nourriture.

METHODE

Les lièvres ont été placés dans deux enclos délimités dans un champ de blé, immédiatement après le traitement du blé avec des doses de dinitro-o-crésolate d'ammonium de 4,5 et 9 kg/ha, ce qui représentait une dose normale d'emploi et une dose double.

Deux animaux par enclos ont été mis en expérience. Cet essai a été répété deux fois.

Nous avons effectué nous-même les dosages de résidus de DNOC sur les blés ainsi que l'analyse des lièvres morts intoxiqués selon les techniques que nous avons décrites précèdemment . .

RESULTATS.

I°) - Résidus de DNOC sur les blés.

Cinq échantillons d'environ 10 g de blé ont été prélevés dans chaque enclos dont la surface était de 400 m2. La moyenne de ces cinq dosages a été calculée pour chacun des six traitements. Les résultats figurent dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 45

Dose de DNOC N H_4 pulvérisée	Résidus de DNOC sur blé µg/g		
kg/ha	Essai I	Essai 2	Essai 3
4,5	24I	287	I07
9	608	678	5I6

2°) - Mortalité observée.

TABLEAU N° 46

Résidus de DNOC sur le blé en µg/g	Mortalité	Référence des lièvres
24I	I sur 2	I
287	0 sur 2	
I07	0 sur 2	
608	I sur 2	II
678	I sur 2	III
5I6	0 sur 2	

Ces résultats ne permettent naturellement pas de déterminer une valeur même approximative de la DL 50 du DNOC pour les lièvres.

Mais en tenant compte du fait que l'animal qui est mort à 241 ppm était un jeune sujet, peut-être plus sensible, cette expérience a quand même permis de conclure qu'à partir de 500 ppm les résidus de DNOC étaient certainement dangereux pour les lièvres adultes.

Nous avons jugé intéressant d'analyser les organes des animaux morts afin de voir si le lapin et le lièvre métabolisaient le DNOC de la même façon.

Pour des raisons pratiques d'organisation, ces lièvres n'ont pu être analysés immédiatement après leur mort. Nous savions que les échantillons de sang ne pouvaient pas être conservés plus de quinze jours au réfrigérateur au voisinage de 0° sans qu'une altération du DNOC ne s'amorce (voir p. 140). Nous avons donc conservé les cadavres à l'état congelé.

Lièvre	I	pendant	15 jours
-	II	-	3 mois
-	III	-	5 jours

3°) - Détermination de la dose de DNOC absorbée.

Il est difficile de déterminer la quantité exacte de DNOC absorbée par les lièvres que nous avons analysés. La seule façon de les évaluer très approximativement est de multiplier la concentration du DNOC trouvé sur les blés immédiatement après le traitement, par le poids du contenu stomacal. Nous arrivons aux résultats suivants :

TABLEAU N° 47

Lièvres	Sexe	Poids total du corps	Résidus de DNOC sur blé µg/g	Poids du contenu stomacal en g.	Quantités approximatives de DNOC absorbées	
					en mg	en mg/kg
I	♂	I kg 480	24I	44,2	I0	7
II	♂	3 kg 600	608	28,7	I7	5
III	♀	2 kg 920	678	99,6	67	22

Ce calcul suppose qu'au moment de la mort, la majeure partie du blé consommé était encore dans l'estomac, ce qui ne peut être considéré comme certain.

4°) - Concentration du DNOC dans le sang chez les lièvres.

Les échantillons de sang ont été prélevés essentiellement dans le coeur. Les concentrations du DNOC dans le sang ont été les suivantes :

TABLEAU N° 48

Quantités de DNOC supposées absorbées		DNOC dans le sang en µg/g
en mg	en mg/ kg	
I0	7	I4,3
I7	5	23,I
67	22	28,6

Si l'on excepte le cas du jeune levraut, les concentrations du DNOC dans le sang des lièvres sont assez voisines de celles que nous avons trouvées chez le lapin 2 à 6 h après administration d'une dose sublétale, c'est-à-dire de l'ordre de 25 à 30 µg/g.

Par contre chez le lapin, nous avions observé qu'une dose mortelle de I8 mg/kg avait provoqué une hausse de la concentration dans le sang jusqu'à 50 µg/g. Ce taux n'a jamais été atteint chez les lièvres intoxiqués mortellement.

Par ailleurs, la présence de très faibles concentrations d'amino-6-nitro-4-o-crésol a été observée chez les lièvres I et II.

5°) - Concentrations du DNOC et de ses métabolites dans l'urine chez les lièvres.

Les échantillons d'urine ont été prélevés quelques heures après la mort, dès la réception des cadavres au laboratoire. Ils ont été immédiatement acidifiés et placés au réfrigérateur pour éviter leur altération.

L'analyse a été effectuée quinze jours au plus tard après le recueillement, c'est-à-dire dans les délais de bonne conservation (voir p. I43).

Les résultats ont été les suivants :

Comme chez le lapin, nous avons identifié le DNOC lui-même, l'amino-4-nitro-6-o-crésol et l'amino-6-nitro-4-o-crésol. Les résultats des analyses figurent dans le tableau n°49

L'amino-4-nitro-6-o-crésol est excrété en faible quantité chez le lièvre comme chez le lapin.

L'amino-6-nitro-4-o-crésol reste la forme d'élimination la plus importante du DNOC lors des intoxications mortelles, chez le lièvre comme chez le lapin. Pour le lièvre les proportions de ce métabolite dans l'urine

DNOC et ANOC DANS L'URINE CHEZ LES LIEVRES

Dose DNOC supposée ingérée		DNOC		Amino-4-nitro-6-o-crésol		Amino-6-nitro-4-o-crésol	
mg/kg	Totale	Total	µg/ml	Total	µg/ml	Total	µg/ml
7	IO	55	5,5	I7,7	I,7	800	80
5	I7	730	II	2I6	3,2	7776	II7
22	67	65,6	3,2	I8,7	0,9	58,2	2,9

ont été de 92,6 % - 90,3 % et 43,9 % par rapport au total excrété exprimé en DNOC. Pour le lapin elles étaient de 73,I % et 56,6 %.

Par ailleurs, si l'on calcule le rapport amino-6-nitro-4-o-crésol / DNOC, on obtient pour les lièvres les valeurs suivantes :

Lièvre	I	800 / 55	=	I4,5
-	II	7776 / 730	=	I0,6
-	III	58,2 / 65,6	=	0,88

Notons que le cas III est celui d'une femelle en période d'allaitement, tandis que les deux autres concernent des mâles. Peut-être ce facteur a-t-il son importance dans la différence de métabolisme observée.

Pour les lapins intoxiqués mortellement nous avions eu les chiffres suivants : 2,40 et I,47 alors que dans les intoxications bénignes, le rapport ANOC / DNOC était bien inférieur à I.

Nous ne pouvons juger que sur 3 cas de lièvres, ce qui est assez peu, mais il semble bien d'après ces quelques résultats, que chez le lièvre comme chez le lapin, l'intoxication mortelle s'accompagne d'une forte excrétion d'amino-6-nitro-4-o-crésol.

6°) - Concentrations du DNOC et de ses métabolites dans les organes.

Le DNOC et l'amino-6-nitro-4-o-crésol ont été identifiés dans certains organes seulement (Voir tableau N° 50).

a) - Dans les reins.

Ni le DNOC ni l'amino-6-nitro-4-o-crésol n'ont été identifiés dans les reins des trois lièvres analysés.

b) - Dans le foie.

De petites quantités de DNOC et d'amino-6-nitro-4-o-crésol ont été trouvées dans le foie de deux lièvres seulement.

Lièvre II I3,I µg soit 0,C8 µg/g de DNOC
- III I04 µg soit 0,76 µg/g de DNOC
64 µg soit 0,47 µg/g d'amino-6-nitro-4-o-crésol.

Aucun des deux composés n'a été identifié dans le foie du lièvre I.

c) - Dans l'encéphale.

Seul l'encéphale du lièvre II a été analysé. Ni le DNOC ni les dérivés amino-nitrés n'ont été identifiés.

d) - Dans les poumons.

C'est dans les poumons que sont atteintes les plus fortes concentrations de DNOC et d'amino-6-nitro-4-o-crésol.

Lièvre I 640 µg de DNOC soit 33,5 µg/g
42 µg d'amino-6-nitro-4-o-crésol soit 2,2 µg/g

Lièvre II 27I9 µg de DNOC soit 34,5 µg/g
I47 µg d'amino-6-nitro-4-o-crésol soit I,8 µg/g

Lièvre III I860 µg de DNOC soit 35,2 µg/g
3I µg d'amino-6-nitro-4-o-crésol soit 0,58 µg/g

Si l'on fait le rapport amino-6-nitro-4-o-crésol / DNOC, on obtient les valeurs suivantes :

Lièvre I 42/640 = 0,06
- II I47/27I9 = 0,05
- III 3I/I860 = 0,0I.

QUANTITES TOTALES ET CONCENTRATIONS DU DNOC ET DE L'AMINO-6-NITRO-4-O-CRESOL DANS LES ORGANES CHEZ LES LIEVRES

Organes	Lièvre I				Lièvre II				Lièvre III			
	DNOC		Amino-6-nitro-4-o-crésol		DNOC		Amino-6-nitro-4-o-crésol		DNOC		Amino-6-nitro-4-o-crésol	
	Total µg	µg/g	Total µg	µg/g	Total µg	µg/g	Total µg	µg/g	Total µg	µg/g	Total µg	µg/g
Sang		I4,3				23,I		0		28,6		
Poumons	640	33,5	42	2,2	27I9	34,5	I47	I,8	I860	35,2	3I,I	0,58
Reins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Moelle osseuse						I,6		0,8				
Gonades							0	0	0	0	0	C
Encéphale					0	0	0	0				
Foie	0	0	0	0	I3,I	0,08	0	0	I04	0,76	64,4	0,47
Glandes mammaires									37	0,8	0	0
Contenu stomacal	2460	55,5			I672	38,2			6I55	6I,7		

Il apparaît que l'ordre de classement de ces valeurs est le même que pour l'urine.

e) - Dans la moelle osseuse.

I,6 µg/g de DNOC a été trouvé dans la moelle osseuse du lièvre II.

f) - Dans les glandes mammaires.

Le lièvre III étant une hase en période d'allaitement nous avons analysé les glandes mammaires :

0,8 µg/g de DNOC a été trouvé.

CONCLUSIONS.

Cette étude sur les effets du DNOC sur les lièvres lors de la consommation de blé traité, nous amène aux conclusions suivantes :

I) - Lorsque les lièvres se nourrissent de feuilles de blé contenant des résidus de DNOC de l'ordre de 500 à 600 ppm, ils risquent une intoxication mortelle. Or ces concentrations peuvent être atteintes et même dépassées dans certaines conditions de traitement de plein champ. Nous avons constaté que les traitements à bas volume sur des blés peu développés pouvaient laisser des résidus de DNOC de l'ordre de I000 ppm.

2) - Les résultats des analyses pratiquées sur les cadavres de lièvres intoxiqués par le DNOC, nous conduisent aux conclusions suivantes :

a) - Chez les lièvres intoxiqués mortellement, la concentration dans le sang au moment de la mort est de l'ordre de celles que nous avions observées chez les lapins 2 à 6 heures après l'administration d'une dose sublétale.

b) - Comme chez le lapin, l'élimination urinaire du DNOC se fait sous forme de DNOC inchangé et sous forme d'amino-6-nitro-4-o-crésol

et d'amino-4-nitro-6-o-crésol. De même l'intoxication mortelle s'accompagne d'une excrétion importante d'amino-6-nitro-4-o-crésol dans les urines.

c) - Lors de l'analyse des organes ni le DNOC ni l'amino-6-nitro-4-o-crésol n'ont été identifiés dans les reins.

Par contre les poumons ont montré de fortes concentrations de DNOC et contenaient également de l'amino-6-nitro-4-o-crésol.

Le DNOC en faible concentration a été trouvé dans les glandes mammaires d'une hase.

CINQUIEME PARTIE

CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de notre étude toxicologique du DNOC et plus spécialement de son métabolisme, nous avons suivi les étapes suivantes :

I°) - Après une étude critique approfondie des différentes techniques applicables à la détermination du DNOC et de ses dérivés, nous avons mis au point une méthode basée sur la colorimétrie, permettant de doser le DNOC et les deux amino-nitro-o-crésols.

Des techniques d'extraction comportant des séparations par des solvants organiques différents, et par chromatographie sur colonne ont été appliquées à ces trois composés, afin de pouvoir les isoler et les doser à partir de différents milieux : solution aqueuse, urine, sang, organes et plantes traitées.

2°) - Nous avons ensuite appliqué ces méthodes d'analyse à l'étude du métabolisme du DNOC chez le lapin. Les différentes déterminations effectuées à partir des urines, du sang et des organes, nous ont conduite aux conclusions suivantes :

a) - Dans le sang, seul le DNOC a été décelé. C'est sans doute par une imperfection de la technique employée, que l'on peut expliquer le fait que les amino-nitro-crésols n'aient pas été identifiés.

Dans les organes, le DNOC et l'amino-6-nitro-4-o-crésol ont été trouvés.

Dans les urines, le DNOC et ses deux métabolites mono-aminés ont pu être caractérisés et dosés.

b) - L'élimination urinaire du DNOC sous ses différentes formes s'achève 3 à 4 jours après son administration par voie orale. Dans nos expériences, la quantité totale excrétée a représenté 60 % au maximum, de la dose administrée. Cependant, il ne semble pas qu'il y ait d'élimination par les fèces, ni de stockage dans les organes. L'existence d'un ou plusieurs autres métabolites que nous n'aurions pu détecter, n'est donc pas impossible, mais il faut tenir compte également des pertes qui auraient pu se produire au cours des dosages.

c) - La présence de l'amino-6-nitro-4-o-crésol dans l'urine, et dans certains organes tels que les reins apparaît comme très significative. Durant la phase aigüe de l'intoxication, c'est-à-dire six à sept heures après l'administration, le rapport amino-6-nitro-4-o-crésol / DNOC semble dépendre de l'intensité de l'intoxication. Plus l'intoxication est forte, plus la valeur de ce rapport est élevée.

d) - Le dosage du DNOC et des amino-nitro-o-crésols doit être effectué le plus rapidement possible après la mort des animaux. Cependant les échantillons de sang et d'urine peuvent être conservés quelques temps sans altération, dans certaines conditions de température et de pH que nous avons déterminées.

3°) - L'étude des effets toxiques du DNOC sur les lièvres a été également abordée.

a) - L'analyse des cadavres des animaux morts après consommation expérimentale de blé en herbe traité par le DNOC a montré que chez le lièvre, comme chez le lapin, il y avait production d'amino-nitro-o-crésols et que les intoxications mortelles s'accompagnaient d'une forte élimination urinaire d'amino-6-nitro-4-o-crésol. La détermination du rapport Amino-6-nitro-4-o-crésol/DNOC pourrait donc constituer la base d'un test d'exposition, permettant de conclure avec plus de certitude en cas d'intoxication par le DNOC.

b) - Les déterminations de résidus de DNOC sur les blés traités et consommés par les lièvres, font apparaître que des concentrations de 500 à 600 ppm offrent des risques certains d'intoxication pour les animaux.

De telles concentrations ont été atteintes et même largement dépassées lors de traitements précoces effectués à bas volume par voie aérienne, sur des blés peu développés. Par contre les pulvérisations classiques à grand volume par appareil au sol, et sur blé plus avancé, ont laissé des résidus beaucoup moins dangereux, de l'ordre de I00 ppm.

Ces résultats montrent que la nocivité, à l'égard de la faune, de certains pesticides tels que le DNOC, peut être considérablement diminuée chaque fois qu'il est possible de choisir les conditions de traitement optimales pour assurer la protection des animaux sauvages, tout en respectant les intérêts économiques.

B I B L I O G R A P H I E

-:-:-:-:-:-:-

I - ABELE, G. - MONTAG, A. - Archiv. fur toxikologie. Bd. I7,5 p.206 (I958)

2 - AMBROSE, A.-M. - J. of Pharm. and Exptl. Therapeutics 69 274 (I940)

3 - ANGER, V. - Mikrochim Acta 2 4 (I937)

4 - BAERSTEIN, H.D. - Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. I5 25I (I943)

5 - BARNES, J.M. - British Med. Bull 7 23 (I950)

6 - BELA VON BITO. - Ann. der Chem. 269 377 (I892)

7 - BELUOBOHM, P. - MINDER, H. - SABIERS, L. - Deut. Gesundheilsw I9 (I) 3I (I964)

8 - BIDSTRUP, P.L. - PLAYNE, D.J.M. - British Med. J. 2 I6 (I95I)

9 - BIDSTRUP, P.L. - Proc. Roy. Soc. Med. 45 574 (I952)

IO - BIDSTRUP, P.L. - BONNELL, J.A.L. - HARVEY, D.G. - Laucet 262 794 (I952)

II - BOGGS, H.M. - Journal of the J.O.A.C. 47 346 (I964)

I2 - BORSCHE, W. - BOCKER, E. - Ber. deut. Chem. Ges. 37 I844 (I904)

I3 - BREINLICH, J. - Archiv. Toxik I6 26 (I956)

I4 - BRODY, T.M. - Pharmacol. Rev. 7 335 (I955)

I5 - BROWN, A.W.A. - "Insect Control by Chemicals" John Wiley and Sons New-York (I95I)

I6 - BURKATSKAYA, E.N. - Gigiena i Toksikol Novykh Pestitsidor i Klinika otravlenii, Dokl 2-oi (Vtoroi) Vses. Konf 3I3 (I962)

I7 - BUZZO, A. - GUATELLI, M. - Rev. Asoc. Bioquim. Argentina I5 et I6 24 Ano I4 (I949)

I8 - CACCIA, P.A. - Analytical Chemistry 3I I306 (I959)

I9 - CAZENEUVE, M.P. - Bull. Soc. Chimie Paris I7 (3) 204 (I897)

20 - CHAPELLIER, A. - RAUCOURT, M. - C.R. Académie d'Agriculture 20 598 (I934)

2I - CHAPELLIER, A. - RAUCOURT, M. - Annales des Epiphyties 2 I9I (I936) et Ibidem 8 I (I942)

22 - CLOWES, G.H.A. - KELTCH, A.K. - SPRITTMATTER - WALTERS, C.P. - J. Gen. physiol. 33 555 (I950)

23 - CORTI, A.L. - Rev. farm (Buenos-Aires) 95 I57 (I953)

24 - CUTTING, MEHRTENS - TAINTER. - J.A.M.A IOI I93 (I933)

25 - DIANZANI, M.U. - SCURO, S. - Biochem. J. 62 205 (I956)

26 - DODDS. - Laucet 226 I048 (I934)

27 - DUQUENOIS, P. - Annales de Médecine Légale 30 86 (I949)

28 - ENNOR, A.H. - ROSENBERG H. - Biochem. J. 57 203 (I954)

29 - FABRE, R. - Ann. Pharm. franç. 2 I08 (I944)

30 - FABRE R. - TRUHAUT, R. - PERON, M. - Ann. pharm. franç. 8 6I3 (I950)

3I - FABRE, R. - MOUREU, H. - TRUHAUT, R. - CHOVIN, P. - TRUFFERT, L. - PERON, M. - WEBER, S. - Rapport présenté au Congrès Technique National de Sécurité et d'Hygiène du travail. Aix-les-Bains - 5-8-Octobre I950.

32 - FABRE, R. - TRUHAUT R. - Toxicologie des Produit phytopharmaceutiques. Editeur SEDES Paris I954.

33 - FABRE, R. - TRUHAUT R. - VIEL, G. - Annales des Epiphyties 2 I77 (I954)

34 - FABRE, R. - TRUHAUT, R. - Sur l'importance des risques de toxicité à long terme pouvant résulter de l'emploi des pesticides. IVè Congrès International de lutte contre les ennemis des plantes. Hambourg, 8-I5 Septembre I957.

35 - FABRE, R. - TRUHAUT, R. - Précis de Toxicologie. Editeur SEDES Paris I96I

36 - FLEURY, P. - COURTOIS, J. - "Les diastases" Armand Colin PARIS I948

37 - GAUDINEAU, M. - Bull. Technique d'Informations 49 325 (I950)

38 - GIBAN, J. - Annales des Epiphyties I 13 (1953)

39 - GRISON. - voir LODEMAN, EG. "The Spraying of Plants" 1896 (MACMILLAN - New-York)

40 - GUERBET, M. - "L'expertise chimique dans les cas d'intoxication par le Dnitrophénol" A.Maréchal - Paris - 1918.

41 - GUERBET, M. - Annales de Physiologie 8 92 (1932)

42 - GUERBET, M. - MAYER, A. - Annales de Physiologie 8 117 (1932)

43 - HARMSE, A. - Pharm. Weekbl 78 1085 (1941)

44 - HARMSE, A. - Zentral blatt I 382 (1942)

45 - HARVEY, D.G. - BIDSTRUP, PL. - BONNELL, J.A.L. - Brit. Med. J. 2 13 (1951)

46 - HARVEY, D.G. - LANCET 262 796 (1952)

47 - HARVEY, D.G. - J. Comp. Pathol. Therap. 68 54 (1958)

48 - HEYMANS, C. - de VLEESCHOUWER, G. - Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie (Paris) 77 486 (1948)

49 - HEYNDRICKX, A. - AVERMAETE, M. - MAES, R. - SCHAUVLIEGE, M. - Overdruk Uit de mededelingen van de Landbouwhogeschool en de opzoekingsstations van de staat te Gent 1962, Deel XXVII n° 3

50 - HEYNDRICKX, A. - MAES, R. - TYBERGHEIN, F. - Ibidem 1964 - Deel XXIX n° 3

51 - HOMER - Arch. Environ mental Health 3 468 (1961)

52 - HUNTER, F. - Phosphorus metabolism I 297 (1951) Baltimore John Hopkins Press

53 - I.U.P.A.C. - Methods for the measurement of toxic substances in air. Trinitrotoluene - 1959

54 - JANOVSKY, J.V. - ERB, L. - Ber. dtsch. Chem. Ges. 19 2155 5 (1886)

55 - JANOVSKY, J.V. - Ber. dtsch. chem. Ges. 24 971 (1891)

56 - JUDAH, J.D. - Proc. Roy. Soc. Med. 45 567 (1952)

57 - KING, E. - HARVEY, D.G. - Biochem. J. 53 196 (1953)

58 - KING, E. - HARVEY, D.G. - Biochem. J. 53 185 (1953)

59 - KING, E. - HARVEY, D.G. - J. Pharm. and Pharmacol. 6 529 (1954)

60 - KHOKHOL'KOVA. - Gigiena i Sanit. 28 (5) 53 (1963)

61 - LAWFORD, D.J. - KING, E. - HARVEY, D.G. - J. Pharm. and Pharmacol. 6 619 (1954)

62 - LECLERC, E. - DEVLAMINCK, F. - Bull. Centre Belge d'Etude et de Documentation des Eaux 14 246 (1951)

63 - LEHMAN, A.J. - Assoc. Food and Drug officials U.S Quart. Bull. 15 122 (1951) Ibidem 16 3 (1952)

64 - LE MITHOUARD, A. - Paris Medical 27 475 (1915)

65 - LESTER, D. - GREENBERG, L.A. - J.Pharmacol. Exptl Therap. 88 87 (1946)

66 - LOOMIS, W.F. - LIPMANN, F. - J. Biol. Chem. 173 807 (1948)

67 - LORD, K.A. - Annals of Applied Biology 36 113 (1949)

68 - VAN LUITT, P.A. - Archives des maladies professionnelles, Medecine du Travail et Sécurité Sociale 8 262 (1947)

69 - MAGNE, H. - MAYER, A. - PLANTEFOL, L. - Annales de Physiologie 8 I (1932)

70 - MALLAMAIRE, A. - Journées françaises d'études et d'informations consacrées aux insecticides agricoles. Paris - Novembre 1960.

71 - MARTIN, H. - Guide to the chemicals used in crop protection 3rd Eon 1957 (Canada Department of Agriculture)

72 - MASSON R. - "Contribution à l'étude toxicologique du Dinitrophénol" Valantin Paris 1940.

73 - MENZIE, C. - J. Agric. and Food Chemistry 6 212 (1958)

74 - MEYER, A. - DRUTEL, H. - Bull. soc. chimie biologique 17 1455 (1935)

75 - MILLARDET, P.H.A. - Jour. Agr. Prat. 2 707 (1885)

76 - MYERS, D.K. - SLATTER, E.C. - Biochim. J. 67 558 (1957)

77 - VAN NOORT. - Ned Tijdschr Geneesk 104 676 (1960)

78 - PARKER, V.H. - Analyst 74 646 (1949)

79 - PARKER, V.H. - BARNES, J.M. - DENZ, F.A. - British. J. Indust. Med 8 226 (1951)

80 - PARKER, V.H. - Biochem. J. 51 363 (1952)

81 - PARKER, V.H. - Biochem. J. 57 381 (1954)

82 - PARKER, V.H. - Nature I78 26I (I956)

83 - PARKER, V.H. - Biochem. J. 69 306 (I958)

84 - PASTAC, I. - La défense des végétaux 60 - 6I (I956 - I957)

85 - PEARCE, S.J. - SCHRENK, H.H. - YANT, W.P. - U.S Bureau of Mines Report Invest n° 3302 (I936)

86 - PERONNET, M. - TRUHAUT, R. - Journal de chimie et de Pharmacie I8 339 (I933)

87 - PESEZ, M. - POIRIER, P. - "Méthodes et Réactions de l'analyse organique" Tome I Masson Paris (I954)

88 - PESEZ, M. - POIRIER, P. - Ibidem tome 3

89 - "Les Pesticides agricoles", document préparé par le Groupe de travail sur l'emploi des substances toxiques en agriculture du Conseil de l'Europe. Strasbourg, I962.

90 - PETRASCU,S- GROU, E. - Analele institute Cercetari Agron. Romanici 22 509 (I952 - I953)

9I - PFAUNDLER, L. - OPPENHEIMER, A. - Z. anal. Chem. 8 469 (I865)

92 - POLLARD, A.B. - FILBEE, J.F. - Laucet 26I 6I8 (I95I)

93 - Rapport d'un groupe d'étude de l'O.M.S. sur la toxicité des pesticides pour l'homme. Genève, 6 - I3 Juin I956. - n° II4 de la série des rapports techniques de l'O.M.S.

94 - Rapport d'un Comité O.M.S. d'experts des résidus de pesticides et d'un groupe d'experts F.A.O. sur l'emploi des produits antiparasitaires en agriculture. Rome : 9-I6 Octobre I96I. - n° 240 de la série des rapports techniques de l' O.M.S et n° I96 de la F.A.O.

95 - Rapport du Comité d'experts des Insecticides de l'O.M.S. Genève, 23-30 Octobre I96I. - n° 227 de la série des rapports techniques de l'O.M.S.

96 - Rapport d'un Comité d'experts F.A.O. sur l'emploi des produits antiparasitaires en agriculture et d'un Comité O.M.S. d'experts des résidus de pesticides Genève : 30 Septembre- 7 Octobre I963. - n° PL/I963/I3 de la F.A.O.

97 - Rapport d'un Comité d'experts F.A.O. sur l'emploi des produits antiparasitaires en agriculture et du Comité O.M.S. d'experts des résidus de pesticides Rome : I5 - 22 Mars I965. - n° PL/I965/IO de la F.A.O.

98 - RAUCOURT, M. - CR Académie d'Agriculture 23 22I (I937)

99 - RAUCOURT, M. - TROUVELOT, B. - CASTETS, G. - Annales des Epiphyties 4 337 (I938)

IOO - SCHRENK, H.H. - PEARCE, S.J. - YANT, W.P. - U.S Bureau of Mines Report Invest N° 3287 (I935)

IOI - SMITH, J.N. - SMITHIES, R.H. - WILLIAMS, R.T. - Biochem. J. 54 225 (I953)

IO2 - SPENCER, M.C. - ROWE, V.K. - ADAMS, E.M. - IRISH, D.D. - J. Ind. Hyg. Toxicol. 30 IO (I948)

IO3 - STEER, C. - Laucet 26I I4I9 (I95I)

IO4 - STONER, H.B. - THRELFALL, C.J. - GREEN, H.N. - British J. Exptl. Path. 33 398 (I952)

IO5 - THELLOT, B. La Défense des Végétaux 60 6I 33 (I956-I957)

IO6 - TREFOUEL, J.-J.Pharm. Chim. (9) 2 30 (I942)

IO7 - TRUFFAUT, G. - PASTAC, I. - Compte-rendu XIVè Congrès de Chimie Industrielle (I934)

IO8 - TRUHAUT, R. - Annales Pharmaceutiques Françaises II 46 (I953)

IO9 - TRUHAUT, R. - Sur les dangers de cancérisation pouvant résulter de la présence de résidus de pesticides dans les aliments. - Phytiatrie et Phytopharmacie - I955 - n° spécial - p. 57-68.

IIO - TRUHAUT, R. - Le problème des substances étrangères dans les aliments du point de vue cancérologique. - Oncologia - I956 - IX - p. 84-I34.

III - TRUHAUT, R. - Sur les risques de nocivité pour l'homme liés à l'emploi des toxiques dans le traitement des cultures fruitières et maraîchères. - Comptes-rendus des Journées Fruitières et Maraîchères d'Avignon - I956 - p.6I-84.

II2 - TRUHAUT, R. - et VIEL, G. - Les possibilités de contamination des aliments par des produits phytopharmaceutiques. Bull. Sté Scientifique d'Hygiène alimentaire - I956 - 44 - IO4-I3I.

II3 - TRUHAUT, R - VIEL, G. - Sur la prévention des risques de nocivité pouvant provenir de la présence de résidus de pesticides dans les aliments végétaux. - Phytiatrie-Phytopharmacie - I956 - n° 3 - I35-I62

II4 - TRUHAUT, R. - Aperçus sur les risques de nocivité pouvant résulter de la présence de résidus de pesticides dans les aliments. - Comptes rendus du IIIè Symposium sur les substances étrangères dans les aliments. Come, I4-I8 Mai I957.

II5 - TRUHAUT, R. - The off. J. of the International Union of Pure and Applied Chemistry 3 205 (I96I)

II6 - TRUHAUT, R. - VIEL, G. - Lutte antiparasitaire et toxicité. - Bull. techn. d'inform. Ingénieurs Services agricoles - I962 - n° I67 - p. I63-I72.

II7 - VIEL, G. - CHANCOGNE, M. - Annales des Epiphyties 3 et 4, 430, (I95I)

II8 - VIEL, G. - Bull. Technique d'Informations 95 747 (I954)

II9 - WEYL. - Ber dtsch chem. Ges 20 2835 (I887)

TABLE DES MATIERES

pages

AVANT PROPOS I

INTRODUCTION 3

PREMIERE PARTIE

Revue des propriétés générales du DNOC IO

DEUXIEME PARTIE

Mise au point d'une méthode d'analyse : 27

I°) Caractérisation et dosage du DNOC et de ses métabolites : 30

- DNOC 30
- Amino-6-nitro-4-O-crésol 44
- Amino-4-nitro-6-O-crésol 50
- Diamino-4-6-O-crésol 60

2°) Isolement et dosage du DNOC et de ses métabolites à partir des milieux biologiques 65

- Etude des caractères physico-chimiques du DNOC et de ses métabolites intervenant dans le mode d'extraction. 66

- Extraction, séparation et dosage du DNOC et des deux amino-nitro-O-crésol à partir

- d'une solution aqueuse 77
- de l'urine 82
- du sang 87
- des organes 93
- des tissus végétaux 98

TROISIEME PARTIE pages

Etude du métabolisme du DNOC chez le lapin : I02

- Etude des concentrations du DNOC dans le sang I03

- Etude des concentrations du DNOC et de ses métabolites dans l'urine. I08

- Relations entre la concentration sanguine du DNOC et les quantités éliminées dans l'urine. I26

- Elimination du DNOC par les fèces I30

- Etude des concentrations du DNOC et de ses métabolites dans les organes I30

- Transformations du DNOC et de ses métabolites au cours de la putréfaction I40

QUATRIEME PARTIE

Etudes de toxicologie agronomique relatives à certaines applications du DNOC en agriculture : I49

I°) Détermination des résidus de DNOC laissés sur blé par les traitements. I5I

2°) Dosage du DNOC et de ses métabolites dans les lièvres intoxiqués expérimentalement. I63

CINQUIEME PARTIE

Conclusions générales I74

BIBLIOGRAPHIE I77